REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie macromoléculaire

Par :

Benaicha Yamena
Boukhouidem Fouzia

Thème :

Extraction de quelques substances macroléculaires présentes dans l'écorce du Cucurbita. Moschata

Soutenue publiquement le : 30/06/2019, Devant le jury composé de :

MAACHOU H.	Grade : MCB	Univ-MEDEA	Président
YOUCEF ETTOUMI Kh	Grade : MCB	Univ-MEDEA	Examinateur
MADANI L.	Grade : MCA	Univ-MEDEA	Encadreur
ZOUAMBIA Y.	Grade : MCB	Univ-MEDEA	Co-Encadreur

Année universitaire : 2018/2019

Résumé :

Cette étude a pour objectif principal la valorisation des écorces du *Cucurbita.moschata* par l'extraction de quelques composés macromoléculaires tel que la pectine et les polyphénols qu'elles contiennent. L'extraction de pectine en milieu acide à chaud a donné des rendements qui varient avec le temps d'extraction, le pH du milieu réactionnel et la partie de la plante utilisée. Le meilleur rendement a atteint 10.76% (pH=1.25 ; T=80°C ; t=120min)par contre un rendement plus faible a été trouvé avec l'utilisation de l'eau à chaud comme solvant (3.94%). Les résultats de la caractérisation physicochimique des pectines obtenues montrent que le mode d'extraction, les conditions opératoires et la matière végétale utilisée peuvent affecter le rendement et les propriétés physicochimiques et structurale de la pectine. La teneur en composés phénoliques extraites des écorces du *Cucurbita.moschata* a atteint 37%mg GAE/100g de la masse végétale. Ces composés ont montré inhibition légére des bactéries : *Streptocoque ; Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus ; Klebsiella oxitoca ;Entérocoque ; Escherichia coli.*

Mots clés : Cucurbita.moschata, méthode acide à chaud, pectine, polyphenols, antibacterial activity, characterization.

Abstract :

This study has as principal aim the valorization of *Cucurbita.moschata* peel with the extraction of some macromolecular compounds such as pectin and polyphenols which they contain. The pectin extraction in hot acid environment lead to yields varying with extraction time, reactionnal environment pH and the part of plant used. The best yield achieve 10,76% at (pH=1.25 ; T=80^0C ; t=120min), in the other hand a low yield was found with the use of water as solvent (3,94%). The results of pectin physicochemical characterization showed that the extraction mode, operational conditions and the vegetal mass could affect the yield, the structural and physicochemical properties of pectin. The content of polyphenol compounds extracted from *Cucurbita.moschata* peels achieved 37%mg GAE/100g of vegetal mass. These compounds have showed slight inhibition of the bacteries: *Streptocoque ; Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus ; Klebsiella oxitoca ;Entérocoque ; Escherichia coli.*

Key words:

Cucurbita.moschata, hot acid mode, pectin, polyphenols, antibacterial activity, characterization.

الملخص

هذه الدراسة لها كهدف رئيسي هو تثمين قشور كيكيربيتا.موشاتا باستخلاص بعض العناصر الماكروجزيئية كالبكتين و متعددات الفينول التي تحتوي عليها. استخلاص البكتين بواسطة وسط حمضي بالتسخين اعطى مردودات تتغير مع مدة الاستخلاص و وسط التفاعل و جزء النبتة المستعمل. احسن مردود بلغ 10.76 % في(pH=1,25 ,°80م ومدة 120 دقيقة). في حين مردود ضعيف وجد باستعمال الماء الساخن كمذيب (3,95%). نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية للبكتينات المستخلصة اوضحت بأن طريقة الاستخلاص , الظروف العملية ,للاستخلاص والمادة النباتية تستطيع التاثير على المردود والخصائص الفيزيوكيميائية و التركيبية للبكتين.

كمية المواد البوليفينولية المستخرجة من قشور الكيكيربيتا موشاتا بلغت 37% مغ GAE /100غ من المادة النباتية. هذه المكونات اظهرت تثبيط ضعيف لنشاط البكتيريات (*Streptocoque ; Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus ; Klebsiella oxitoca ;Entérocoque ; Escherichia coli)*

المكونات المفتاحية :

كيكيرباتا.موشاتا, طريقة وسط حمضي بالتسخين, بكتين , بوليفينول , نشاط ضد البكتيريا , دراسة الخصائص

.

Les mots clés :

Écorce de Cucurbita moschata ; pectine ; caractérisation physico-chimique, Activité antibactérienne, polyphénols

REMERCIEMENTS

- *Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant, de nous avoir guidé vers la science et le savoir et de nous avoir donné courage et volonté pour élaborer ce modeste travail.*
- *Nous tenons t à exprimer le témoignage de toute notre gratitude et nos remerciements :*

A notre mes promotrices Mme Madani Laila et Mme Zouambia yamina :

- ✓ *Pour nous avoir encadré et supervisé ce travail;*
- ✓ *Pour l'aide, les conseils et les encouragements qu'il nous a prodigués*
- ✓ *Merci pour sa disponibilité et son écoute*

Nous remercions également les jurées: Mme Maachou Hamida et Mme Youcef Ettoumi Khadija pour le temps et l'effort consacré pour évaluer et examiner notre travail. Nous vous remercions surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions

Au personnel du laboratoire de l'université Média Pour leurs aides et leur patience.

- ✓ *Remerciements distingués*

A toutes celles et ceux qui nous ont soutenues et aidés, de près ou de loin, dans l'élaboration de ce modeste travail.

- ✓ *L'expression de nos reconnaissances*

Dédicace

-Je dédie ce modeste travail à :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu leur procure bonne santé et longue vie, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A mes frères : Kamel et sa femme ; Naim et sa femme et Hamza

A mon grand-mère.
A petites poussins : Mohammed Haithem, Ritadje et Randa.
A toute ma famille Benaicha, et mes amis :
Fouzia , Mona ,Wahiba, Hizia et Nadjla.
A mon binôme Fouzia et toute la famille Boukhuidem .Et à tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

BenaichaYamena

Dédicace
Je dédie ce modeste travail à :

Aux deux êtres qui me sont les plus chers au monde mon père et ma mère à qui je dois le mérite d'être arrivée là qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et mon affection.

-Mes frères : Yacine, Bilal, Khaled et Yousef.

-Mon oncle et mon frère : Amine.

-A tout la famille Boukhouidem.

-A tous mes amies : Yamena, Mona, Wahiba, Assia, Rima, Ahlem, Aicha et Khadîdja.

-A ma copine et camarade Yamena et tout la famille benaicha.

- Tout la promotion chimie macromoléculaire 2019.

Fouzia Boukhouidem

Sommaire

Introduction général……1
Chapitre I : synthèse bibliographique
I-1. Cucurbita moschata:
I.1.1. Généralité sur les Cucurbitacées……3
I.1.2.Classification des cucurbitacées……3
I.1.3. Généralité sur les Cucurbita moschata……6
I.1.4.Description botanique de la doubeurre (Butternut)……8
I.1.5.Composition et utilisation de la courge musquée……9
1.2. Pectines
1.2.1. Définition……10
1.2.2. Caractérisation structurale des pectines……11
1.2.2.1Homogalacturonanes……12
1.2.2.2.Xylogalacturonanes……14
1.2.2.3Rhamnogalacturonanes……14
a-Rhamnogalacturonane I (RG-I)……14
b- Rhamnogalacturonane II (RG-II)……14
I.2.3.Caractérisation macromoléculaire de la pectine……14
I.2.4.Extraction des pectines……15
I.2.5.Propriétés des pectines……18
A. Solubilité des pectines……18
B. Stabilité des pectines……18
C. Propriétés gélifiantes……18
D. Propriétés viscosifiantes……19
I.2.6.Domaines d'applications des substances pectiques……19
A. Industrie alimentaire……20
B. Industrie pharmaceutique……20
C. Industrie cosmétique ……20
I.3. Les polyphénols……21
I.3.1. Généralités……21
I.3.2. Définition……21
I.3.3.Classes des Polyphénols……21
I.3.3.1 les flavonoïdes……22
I.3.3.2 Acides phénoliques ……23
I.3.3.3 Les tanins……24
II.1. Introduction……25
II.2. Produits et matériels……25
II.3. Préparation du matériel végétal……26
II.3. Détermination de la teneur en eau……27

II.4. Extraction des substances pectiques…….……27
II.4.1. Protocole expérimentale……..….27
II.4.2.Calcul du rendement en pectine extraite……..……..30
II.4.3. Analyse et caractérisation physicochimique des pectines extraites…….30
II.4.3.1. Test organoleptique……..…30
II.4.3.2. Solubilité de la pectine…….……30

II.4.3.3. Détermination du poids équivalent (PE)……...…….30

II.4.3.4. Détermination de la teneur en méthoxyle (MeO%)…….30

II.4.3.5. Déterminateur en acide anhydrouronique total (AUA)……..31

II.4.3.6. Détermination du degré d'estérification (DE)……..31
II.4.3.7. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier……..31

II.5. Extraction et quantification des composés polyphénoliques……..32

II.5.1 Extraction des polyphénols totaux…….32

II.5.1 Dosage des polyphénols totaux……..33

II.6.Evaluation du pouvoir antibactérien……..34

II.6.1.Préparation des échantillons……34

II.6.2. Mode opératoire…….….34

II.6.2.Lecture de résultats……..35

Chapitre II Matériels et méthodes

III.1. Teneur en eau de la matière végétale …….36

III.2. Caractérisation des substances pectiques……..37

III.2.1. Aspect…….37
III.2.2. Rendement en pectines…….…….37
III.1.3. Solubilité de la pectine dans l'eau……..……41
III.1.4. Poids équivalents…….…….. 42

III.1.5.Degré d'estérification…….……43
III.1.6. Teneur en méthoxyle: (MeO%)……...43
III.1.7.Spectroscopie FTIR …….…….. 44

II.2. dosage des polyphénols totaux…….…….48
III.3. Activité antibactérienne…….49

Liste de figure

Chapitre I: Cucurbita moschata:

Figure I-1 : Echantillon de fruits du genre Cucurbita ……..5
Figure I-2 : la doubeurre (courge butternut) ……7
Figure I-3: constituants d'un fruit de courge musquée (la doubeurre) ……9
Figure I-4 : Structure schématique d'une molécule de pectine ……12
Figure I-5 : Structure primaire de l'homogalacturonane ……..13
Figure I-6 : Structure chimique de xylogalacturonane ……14
Figure I-7 : Différentes macromolécules présentes dans la paroi cellulaire végétale ….16
Figure (I-8) : Différentes étapes du procédé industriel d'extraction de pectine……17
Figure I-9 : structure de kaempférol identifiés dans la *Cucurbita maxima*……*22*
Figure I-10 : Structures des acides hydroxybenzoïques identifiés dans l'écorce de *Cucurbita pepo*……*23*

Chapitre II: Matériels et méthodes

Figure I-11: Structures des acides hydroxycinnamiques identifiés dans la *cucurbita.pepo*.....*24*
Figure II-1:Ecorces fraiches du butternut……....26
Figure II-2:A-Poudres des du butternut , B- Poudres des graines du butternut……. 26
Figure II-3:Protocole expérimentale d'extraction des pectines…….…..29

Chapitre III: Résultats et discussions

Figure III-1:Teneur en eau des écorces de courge musquée (butternut)…….…36
Figure III-2:Echantillons de pectine extraite de courge musquèe à partir :
A- graines, B- écorces…….……37
Figure III-3:Rendement en pectines extraites des différentes parties du fruit de la courge musquée (Butternut) par H2SO4à différents temps d'extraction(T=80°C, pH=1.67)……..38
Figure III-4: Rendement en pectines extraites des différentes parties du fruit de la courge musquée (Butternut) par H2SO4 à différents pH (T=80°C, t=90 min)……..39
Figure III-5: Rendement en pectines extraites des écorces sèches du fruit de la courge musquée (Butternut) par H2SO4 pH=1.25 et par l'eau (T=80°C, t=120 min)……..……..40

Figure III-6:Teneures en mèthoxyles des pectines extraites des ecorces du fruit de la courge musquée (Butternut) par H2SO4(T=80°C)…….44

Figure III-7: spectre FTIR de la pectine extraite des écorces sèches de courge musquée (t=120 min, T=80°C) : ----eau, ---- acide ……..45

Figure III-8: spectre FTIR de la pectine extraite des écorces sèches de courge musquée (t=90 min, T=80°C) :----1.67, ----1.25……..46

Figure III-9: spectre FTIR de la pectine extraite des écorces et graines sèches de courge musquée (t=90 min, T=80°C) :----1.67, ----1.25…….46

Figure III-10: spectre FTIR de la pectine extraite des écorces sèches de courge musquée (pH=1.25, T=80°C) :----90 MIN, ----90 min, ----120 min…….47

Figure III-11:Courbe d'étalonnage (étalon : acide gallique)……48

Figure III-12:Diamètres des zones d'inhibition……50

Liste des tableaux

Chapitre I: synthèse bibliographique

Tableau I-1: Les principales espèces et variétés du genre Cucurbita ……..5
Tableau I.2 : Description botanique de la doubeurre ……..8

Tableau I.3 : Différents nutriments de la courge musquée ……..10

Tableau I-4 : Teneur en substances pectiques de quelques végétaux ……...….11

Tableau I-5 : Les teneurs en tanins dans les graines feuilles et la chaire de la courge.....24

Chapitre II: Matériels et méthodes

Tableau II-1:Conditions opératoires de l'extraction des pectines……..28

Tableau II-2: Déférentes concentrations utilisées pour le test antibactérien……..34

Chapitre III: Résultats et discussions

Tableau III-1:Résultats du test de solubilité des pectines extraites ……...41

Tableau III-2:Poids équivalentes des pectines ……..42

Tableau III-3**:** Diamètres et pourcentages d'inhibition de l'extrait éthanoïque des polyphénols extraits des écorces de la courge musquée…….49

LISTE DES SYMBOLE ET DES ABRIVIATIONS

Symbole	Signification
C	Concentration.
DE	Degré d'estérification
T	Température (C°)
R%	Rendement
(PE)	poids équivalent
MeO%	teneur en méthoxyle
AUA	teneur en acide anhydrouronique total
FTIR	spectre infra rouge
d	densité
AG	Acide Gallique
PPT	poly phénol totaux
(HM)	Hautement méthyles
(LM)	faiblement méthyles
(DA)	degré d'acétylation
PI	Pourcentage d'inhibition
DI	Diamètre d'inhibition

Introduction générale

Ces dernières années, une attention accrue est destinée au développement des possibilités de transformer tous le contenu des nutriments naturels en ingrédients incorporelles intervenant dans les produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Dans ce cadre d'intérêt la recherche, l'isolement et la caractérisation des composés bioactifs issus des plantes et qui constitue une des voies de la valorisation de la biomasse agroalimentaire ne cessent d'être la destination de plusieurs chercheurs.
L'exploitation des écorces des plantes, qui font partie le plus souvent des déchets agroalimentaires, en vue de leur valorisation a bénéficié d'un regain d'intérêt de la part de plusieurs travaux scientifiques.

C'est dans ce même volet que s'inscrit notre travail, dans lequel on a visé comme ambition principal de trouver une voie originale de valoriser les écorces de la courge musquée ; une espèce des végétales très cultivées au monde selon le FAO (organisation des nations unies de l'alimentation et l'agriculture.

Une des voies possibles est d'exploiter leur contenu en polysaccharides particuliérement les pectines qui sont présentes en quantité appréciable chez les végétaux, ainsi que les composés phénoliques. De part des propriétés protectrices majeures confiées à la courge, son coût faible sa grande abondance , comme étant une source d'extraction des composés bioactifs tel que les pectines et des composés polyphénoliques font de ces derniers des produits de grand intérêts avec un coût très faible.

Nous avons subdivisé notre travail en deux grandes parties :

- La première partie propose une mise au point bibliographique sur l'espèce étudiée le Cucurbita.moschata, en présentant leur description botanique, leur composition. nous présenterons aussi une rubrique bibliographique sur les pectines et les polyphénols, comptant leur présence dans la plante, propriété, structure chimique, utilisation, et les techniques d'extractions.

- Le seconde partie représente l'étude expérimentale dont laquelle, chapitre décrivant le matériel et méthodes et qui fait le bilan précis des outils, concepts et équipement utilisés ou cours de ce travail. Elle englobe aussi tous les résultats du travail expérimental entrepris dans cette étude ainsi que leurs interprétations. Cette partie se termine par une conclusion générale.

I I.1. *Cucurbita moschata :*

I.1.1. Généralité sur les Cucurbitacées :

Les Cucurbitaceae (Cucurbitacées) sont une famille de plantes dicotylédones de l'ordre des Cucurbitales, elles sont originaires des régions tempérées chaudes à tropicales. Depuis leur apparition sur le continent américain, elles n'ont cessé de participer au développement de l'agriculture naissante en Amérique, d'où leur culture s'est propagée à tous les continents.

Il s'agit de plantes herbacées, parfois sous-ligneuses à la base ou plus rarement ligneuses, annuelles ou vivaces. Elles sont plus ou moins rampantes ou grimpantes grâce à des vrilles caulinaires spiralées (à la base des pétioles placés à l'équerre du plan tige-feuille).

I.1.2.Classification des cucurbitacées :

Dans la grande famille des cucurbitacées, environ 130 genres différents ont été recensés par les botanistes, et 800 espèces qui en découlent [1]. La famille des Cucurbitacées est représentée par plusieurs genres, les plus importants sont : *Citrulus* (pastèque), *Cucumis* (concombre) et *Cucurbita* (courge). [2 ;3]

Le genre Cucurbita (Figure I-1) consiste en genre primitive du royaume des plantes vu son pouvoir de développement morphologique très flexible et élastique facilement adaptable à toutes les conditions environnementales. Elle fait partie des plus anciennes plantes cultivées qui viennent des témoignages archéologiques : des graines de Cucurbita.pepo ont été découvertes dans des sites qui datent de 10000-30000 ans A.J à Florida. [4]

Les graines de ce genre ont la faculté de préserver leur pouvoir germinatif, ce qui expliquerait leur dissémination sur toute la zone tropicale du globe, en Europe, elles ne connurent véritablement leur heure de gloire qu'au XIXème siècle. [5]



Figure I-1 : Echantillon de fruits du genre Cucurbita

Dans le genre Cucurbita on trouve dix espèces sauvages qui ne sont pas généralement commestibles et six autres espèces cultivées pour des fins d'alimentation et même de décorations :[6]

- Cucurbita.argyrosperma Huber ou Cucurbita mixte
- Cucurbita. Ficifolia Bouché
- Cucurbita maxima
- Cucurbita. moschata
- Cucurbita.pepo
- Telfairia occidentalis Hook

Dans la région méditéranéene trois espèces cultivées régnent : [4]

- Cucurbita maxima: cette espèce rassemble plusieurs variétés dont le potiron, le potimarron et le giraumon
- Cucurbita moschata: nom botanique de la courge musquée et de la courge butternut
- Cucurbita pepo : nom botanique commun à la citrouille, au pâtisson, à la courge spaghetti et à la courgette

Le tableau I-1 représente les principales espèces et variétés de Cucurbita. Leur forme peut varier d'une variété à une autre au sein d'une même espèce.

Tableau I-1: Les principales espèces et variétés du genre Cucurbita[7].

espèces	variétés	Photos
Cucurbita. moschata	**Butternut**	
	Muscade de Provence	
C*ucurbita. pepo*	**Pâtisson**	
	Citrouille	
	Spaghetti	
Cucurbita maxima	**Giraumon**	
	Potimarron	
	Potiron	
Cucurbita ficifolia	**Courge de Siam**	

Cucurbita mixta ou argyrosperma	**Green striped cushaw**	
	White Cushaw	
***Telfairia occidentalis* Hook.**	***Telfairia occidentalis* Hook.**	

I.1.3. Généralité sur les Cucurbita moschata :

L'espèce Cucurbita moschata fait partie des espèces qui composent la grande famille des Cucurbitacées. Elles font partie des courges "coureuses" ou rampantes, qui forment de longues tiges.

L'ancêtre sauvage de *Cucurbita moschata* est toujours inconnu, mais de récentes recherches sur les relations phylogénétiques entre les taxons sauvages et domestiqués de *Cucurbita*, basées principalement sur des données ADN, suggèrent qu'il sera probablement découvert dans les basses terres du nord de l'Amérique du Sud. Les témoignages archéologiques sur l'association de *Cucurbita* cultivées avec l'homme remontent à 5000 ans avant J.-C.

Le *Cucurbita moschata* est l'espèce de *Cucurbita* la plus tolérante à la chaleur et la plus commune en Afrique tropicale. Elle est très probablement cultivée dans tous les pays d'Afrique tropicale, mais est plus importante en Afrique australe qu'en Afrique de l'Est et de l'Ouest.

Les courges musquées sont en général des espèces coureuse, leurs feuilles sont vertes marbrées du blanc, entières ou avec des lobes peu prononcés, elles présentent des zones décolorées argentées sur les nervures qui leur permet une protection contre le soleil.

Ce groupe est subdivisé en deux catégories :

- ✓ Les courges en forme de poire plus ou moins allongées jusqu'à 1 mètre de long et les graines se trouvent dans la partie renflée ;
- ✓ Les courges en forme de potiron, très côtelées, légèrement aplaties et la chair est d'une couleur orange foncée.

Le *Cucurbita*. *moschata* a un pédoncule du fruit dur, légèrement anguleux, s'élargissant à l'apex, des tiges dures légèrement cannelées, et des feuilles tendres modérément lobées.Les fruits, très variables en poids, 10-15kg pour la courge musquée de Provence.

Dans le cadre de notre étude, une variété d'espèce de courge musquée (*Cucurbita moschata*) a été choisie c'est la doubeurre (figure I-2), parfois appelée courge Butternut ou par anglicisme Butternut.



Figure I-2 : la doubeurre (courge butternut)

I.1.4.Description botanique de la doubeurre (Butternut) :

La description botanique de la doubeurre est résumée dans le Tableau I-2.

Tableau I.2 : Description botanique de la doubeurre [4-6]

Description de la plante, du fruit et de graines	**Photo**
La plante Ordre : Cucurbitales Famille : Cucurbitaceae Genre : Cucurbita Nom français : doubeurre Nom latin : Cucurbita muschata	

Caractères

Graines ovoïdes de 1-2cm x 0.5-1cm, de, à peu près moitié moins larges que longues, blanches ou fauves parfois grises brunes à ocre foncé pelliculeuses,

Ecorces beige, dure bien que peu épaisse (0,5 à 1,5 millimètre), qui lui assure une longue conservation, de 6 à 10 mois, dans un endroit sec et frais

Feuilles : présentent des angles relativement marqués, recouvertes de nombreux poils non spinescents. Les nervures des feuilles sont très souvent bordées d'une couleur vert-gris.

Floraison : Cette plante est monoïque. Chaque plant porte des fleurs mâles et femelles séparées

Fruit : Les fruits de la variété 'Butternut' pèsent entre 1 et 3 Kg. Ils ont une forme de bouteille. La partie cylindrique du fruit est pleine, on trouve seulement une petite cavité avec des graines dans la partie renflées.

Aspect de l'épiderme de fruit : couleur ocre à maturité

Aspect de la chair de fruit : couleur jaune orangé, gout de noisette.

Forme du pédoncule du fruit : anguleux (5 angles)





I.1.5.Composition et utilisation de la courge musquée :

Les nutriments les plus importants que renferme la citrouille sont : les vitamines A, B2, C et E ; l'acide pantothénique et les oligo-éléments (Phosphore, Magnésium, Potassium, Fer, Zinc, Manganèse et Cuivre) (Attarde. et *al*., 2010).

La courge musquée se compose d'une écorce dure qui représente environ 17,95%du poids total de la courge, de chaire constituant 78.69% et des grainesqui ne prennent pas plus de 3.63%. [8]



Figure I-3: constituants d'un fruit de courge musquée (la doubeurre)

La valeur nutritionnelle estimée pour 100 g de courge musquée est donnée sur le Tableau I.3. [9]

Du fait de sa forte teneur en caroténoïdes, cette courge est donc un antioxydant intéressant. Les caroténoïdes ont aussi le pouvoir de lutter contre le vieillissement des cellules. Aussi, la présence de fibres fait de la butternut un légume idéal pour le bon fonctionnement intestinal. Ce légume est aussi bénéfique pour le foie**.**

La doubeurre renferme également des vitamines. De ce fait, cette courge aide ainsi à limiter le développement de maladies cardio-vasculaires et celles liées au vieillissement. La vitamine C aide aussi à réduire les problèmes de type pulmonaires (asthme).

Enfin, riche en magnésium, la butternut est excellente contre l'hypertension artérielle.

Tableau I.3 : Différents nutriments de la courge musquée [10]

Nutriments	**Quantités**		
	pulpe	**Feuilles**	**graines**
Protéines	0.7g	4g	23.4g
Lipides	0.2g	0.2g	46.2g
Glucides	2.2g	4.4g	21.5g
Eau	95g	89.2g	5.5g
Fibres	1g	2.4g	2.2g
β-carotène	450µg	3600µg	
Acide ascorbique	14mg	80mg	
Ca	29mg	477mg	57mg
Fe	0.4mg	0.8mg	2.8mg
P	19mg	136mg	900mg

Sur le plan thérapeutique, la courge est cultivée dans le monde entier, non seulement dans nos régimes alimentaires mais aussi, elle a été employée traditionnellement en médecine dans plusieurs pays, car elle présente de nombreuses propriétés biologiques telles que les activités antidiabétique, antihypertension, antitumurale, antibactérienne, antiinflammatoireantioxydantes, immunomodulation, antihypocholestérolémiante. [6]

Les graines et ses huiles riches en acides gras mono-insaturés et polyinsaturéssont utilisées pour soulager les troubles bénins de la prostate, ces dernières renferment des composés phytostérols reconnus pour leurs bienfaits sur la santé. [9]

Les graines de la courge sont utilisées pour la fabrication de vermifuge qui permetle soulagement des crampes abdominales et élimination des vers intestinaux [6]

Dans le domaine agroalimentaire, de nombreux produits et préparations à base de courge sont commercialisés tels que les confitures, sirops et gelées et aussi utilisées comme additif dans divers produits destinés pour notre alimentation [10 ;11]

Notre étude s'intéresse aux deux différents composés de la paroi cellulaire végétale, plus particulièrement les pectines et les polyphénols qui sont décrits dans cette partie.

1.2. Pectines :

1.2.1. Définition :

Les pectines sont des macromolécules complexes de nature glucidique qui peuvent être extraits de la paroi par de l'eau chaude, des acides dilués ou des chélateurs de calcium. Elles sont présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules végétales comme un véritable ciment biologique [12]. Elles sont utilisées en tant que stabilisant épaississant agent

gélifiant émulsifiant, et comme véhicule de médicaments dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

La nature des pectines évolue avec l'âge des tissus végétaux, elles se trouvent sous deux formes [12-14].

- ✓ La protopectine : insoluble puisqu'elle est liée aux autres composants, assure la rigidité des tissus végétale.
- ✓ L'acide pectique : soluble dans l'eau à froid, cette forme apparaît au cours de mûrissement quand leur dégradation en sucres et en acide ait lieu par voie enzymatique.

La pectine est un carbohydrate structural présent dans les parois cellulaires, sa teneur dans les plantes, est décrite sur le tableau I-4. [16]

Tableau I-4 : Teneur en substances pectiques de quelques végétaux

L'origine	**Teneur en pectines (%)**
Pomme	4.5
Carotte	10
Raifort	15
Tomate	03
Marc de pomme	15-20
Capitules de tournesol	25
Marc de betterave	15-20
Albédo des agrumes	30-35

1.2.2. Caractérisation structurale des pectines:

La variabilité structurale des pectines en fait l'un des polysaccharides pariétaux les plus complexes. On peut les diviser en deux sous-catégories :

- les substances pectiques acides (homogalacturonane, rhamnogalacturonane de types I et II)
- les substances pectiques neutres (arabinanes, galactanes, arabinogalactanes) associées de manière covalente aux rhamnogalacturonanes au sein de la macromolécule pectique [17-20].

Les pectines sont des polysaccharides caractérisés par un squelette d'acide α-D-galacturonique interrompu de faibles quantités de α-L rhamnose plus ou moins ramifiés [21]. Sur le plan structural, le modèle généralement accepté décrit les pectines comme un enchaînement de deux

structures majoritaires, présentant une chaîne principale homogalacturonique (zone lisse nommée HG) et une chaîne rhamnogalacturonique (zone hérissée nommée RG) présentant des substituants d'oses neutres (Figure I-4) [22].

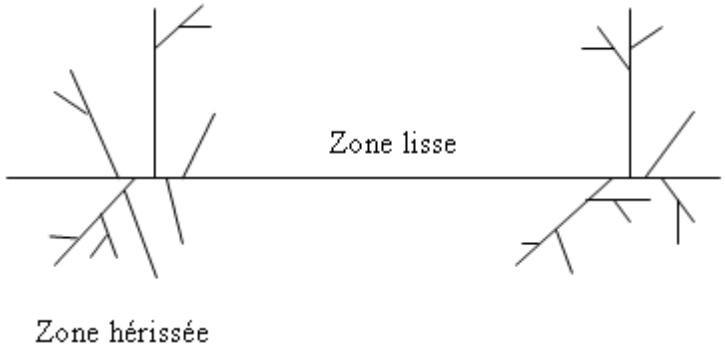


Figure I-4 : Structure schématique d'une molécule de pectine. [12]

1.2.2.1 Homogalacturonanes :

Les homogalacturonanes sont la principale chaîne qui compose les pectines (représentant plus de 60% des pectines) [17] et sont également appelés « zone lisse ». Ce sont des polymères d'acide α-D-galacturonique liés en (1→4). La longueur de ces chaînes peut aller de 70 à 100 résidus d'acide galacturonique dans le citron, la betterave sucrière ou dans la pomme [14].
Les pectines sont principalement caractérisées par leur teneur en acide galacturonique (AG), la longueur des chaînes d'acides galacturoniques (masse moléculaire) et le nombre de substituants autre qu'osidiques.

Les acides α-D-galacturonique peuvent être sous forme acide ou être estérifiés par du méthanol en C6 et/ou par de l'acide acétique en O-2 et /ou O-3 [12] En fonction de ces estérifications, les pectines sont caractérisées par un degré de méthylation (DM) et un degré d'acétylation (DA) qui correspond au rapport des acides galacturoniquesestérifiés (méthylés ou acétylés) sur les acides galacturoniques totaux (Figure I-5).

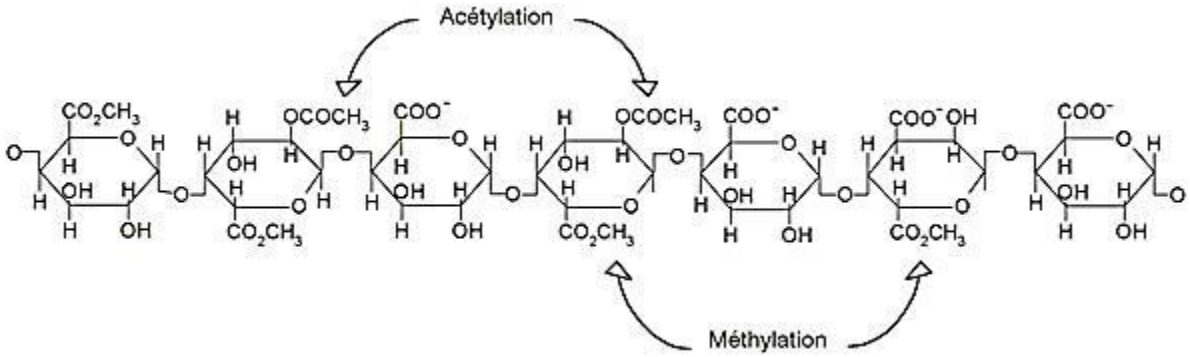


Figure I-5 : Structure primaire de l'homogalacturonane [23].

D'un point de vue fonctionnel, on distingue trois catégories de pectines :

- Les acides pectiques possèdent un degré de méthylation inférieur à 5% (DM<5)
- Les pectines faiblement méthylées (LM) présentent un degré de méthylation inférieur à 50% (DM<50).
- Les pectines hautement méthylées (HM) présentent un degré de méthylation supérieur à 50% (DM>50).

Les pectines sont capables de former des gels par différents mécanismes quel que soit leur degré de méthylation. Le mécanisme de gélification pour les pectines HM correspond à la formation d'interactions hydrophobes entre les groupements méthyles et de liaisons hydrogènes entre les groupements carboxyliques des résidus d'acide galaturonique non estérifiés et les alcools secondaires en présence des sucres neutre [24]. Les sucres limitent l'activité de l'eau ce qui favorise les interactions pectines-pectines par rapport aux interactions pectines-eau .[25]
Les pectines LM sont capables d'avoir un mécanisme de formation de gel basé sur les interactions entre les cations (Ca^{+}) et les groupements carboxyliques déprotonés des acides galacturoniques.

Le degré d'estérification des pectines a un impact sur la flexibilité de la molécule : plus le degré d'estérification est faible, plus la pectine est rigide [26]. Dans les parois végétales, les pectines sont généralement hautement méthylées. Ainsi, dans la betterave sucrière et la pomme, des DM de 70 à 80% sont rapportés. [26-28]

1.2.2.2. Xylogalacturonanes :

Les homogalacturonanes peuvent également être substitués par des unités simples de β-Dxyloselié sur le C3 des acides galacturoniques. Ces zones sont appelées xylogalacturonanes (Figure I-6). Dans la pomme, ces liaisons sont regroupées dans des zones spécifiques des homogalacturonanes qui présentent des degrés de substitution de l'ordre de 75% [29].

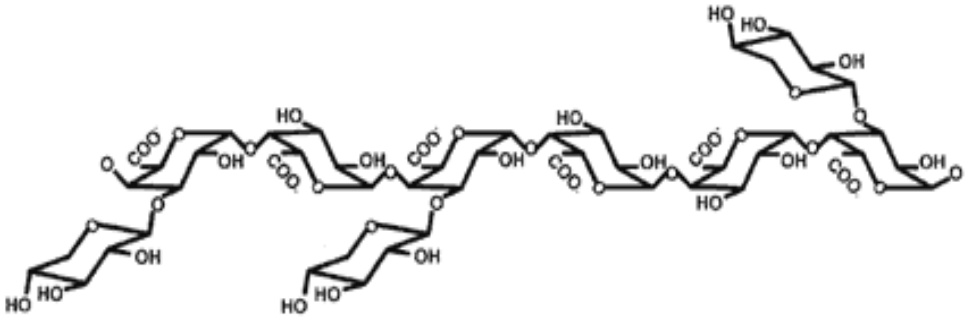


Figure I-6 : Structure chimique de xylogalacturonane [30].

1.2.2.3 Rhamnogalacturonanes:

a- Rhamnogalacturonane I (RG-I):

Les rhamnogalacturonanes de type I représentent de 20 à 30% des pectines de la paroi. Leur squelette consiste en un enchaînement de résidus d'acide α-D-galacturonique liés en (1→4) et de résidus de α-L-rhamnose liés en (1→2).

Les chaînes majoritaires sont desα-L-arabinanes, β-D-galactanes et des arabinogalactanes de type I ou de type II [14 ;17 ;22]. Ces chaînes sont liées sur le squelette rhamnogalacturonique par le C4 de façon majoritaire ou par le C3 du résidu de rhamnose [31].

b- Rhamnogalacturonane II (RG-II) :

Les rhamnogalacturonanes de type II ont été identifiés dans des hydrolysats enzymatiques de parois [22] et ainsi nommés à partir de leur composition ; cependant cette dénomination est trompeuse, car ils sont caractérisés par un squelette homogalacturonique. Ils sont constitués d'un enchaînement de huit résidus d'acide galacturoniques liés en β (1→4), substitués par quatre chaînes latérales d'oligosaccharides [17]. Le rhamnogalacturonane est libéré des structures complexes de pectines grâce à des enzymes tels que les pectinases.

I.2.3. Caractérisation macromoléculaire de la pectine :

La pectine est un polysaccharide, composé de différentes entités structurales secondaire, qui changent avec la méthodologie d'extraction, la matière première, et d'autres facteurs

environnementaux. Les caractéristiques macromoléculaires de la pectine incluent principalement leur masse molaire et leur conformation, et ce sont des causes déterminantes des applications industrielles des pectines.

La masse moléculaire et par voie de conséquence le degré de polymérisation d'un polysaccharide est une caractéristique physico-chimique importante. La masse moléculaire de la pectine est nettement moins élevée que celle de la cellulose ou de l'amidon. Les mesures des masses molaires sont difficiles en raison de l'hétérogénéité, l'insolubilité dans l'eau, et l'agrégation de la pectine ; le caractère polyélectrolyte de la pectine doit également être pris en considération. Les valeurs de masses molaires, qui s'étendent de quelques dizaines à plusieurs centaines de kilo daltons (k Da), dépendent non seulement de la méthode employée mais également de l'origine de la pectine et des moyens de l'extraction.

Basé sur la viscosimétrie, la masse molaire moyenne de la pectine commerciale varie entre 50,000 et 150,000 daltons [11].

I.2.4.Extraction des pectines :

Compte tenu des nombreuses macromolécules présentent dans la paroi cellulaire végétale (figure I-7), les protocoles d'extraction doivent être suffisamment sélectives pour permettre l'extraction des pectines de manière privilégiée tout en maintenant l'intégrité de la pectine [14 ; 33]. Dès lors, la technique d'extraction des substances pectiques la plus appropriée s'effectuera en fonction de la nature des pectines mais également des liaisons établies entre les différents polymères pariétaux [32].

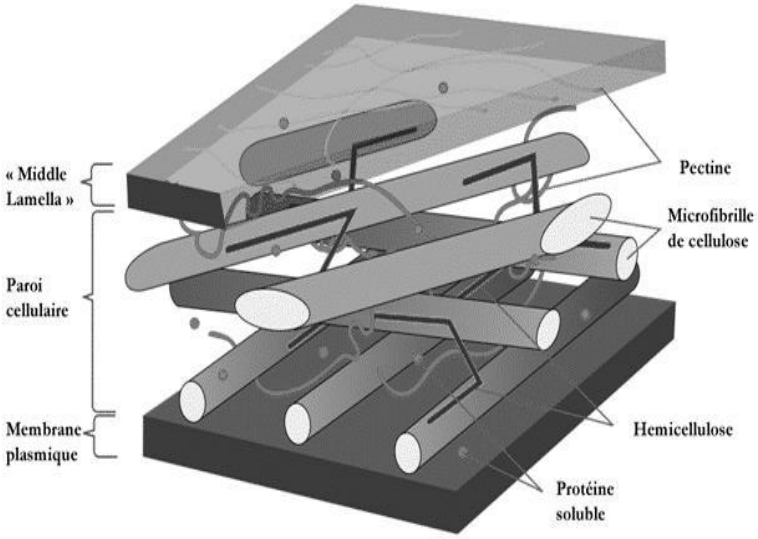


Figure I-7 : Différentes macromolécules présentes dans la paroi cellulaire végétale

Les pectines peuvent être liées ou non liées aux autres polymères pariétaux par conséquent trois différentes méthodes permettent leur extraction des parois végétales :

- Méthode chimique
- Méthode enzymatique
- Méthode physique.

Les protocoles mis en place sont généralement fondés sur la différence de solubilité des dérivés pectiques cette dernière dépend de leur masse moléculaire, de la présence de chaînes latérales, mais aussi et surtout du degré de méthylestérification et de la distribution de ces groupements méthyles [14 ; 33]

L'extraction à l'eau bouillante à partir d'un matériel végétal permet d'obtenir des pectines HM (Hautement Méthylestérifiées). Par contre, une extraction à l'eau bouillante en présence d'agents séquestrant les ions Ca^{2+}(EDTA, CDTA, l'imidazole, oxalate d'ammonium) permet d'extraire les pectines FM(Faiblement Méthylestérifiées). Pour obtenir les pectines insolubles (acide homopolygalacturonique), une extraction chimique par un acide à chaud ou une base à froid est généralement réalisée [34], dans ce cas le traitement acide à chaud est considéré comme méthode relativement douce dans la mesure où, les séquences homogalacturoniques ne sont pas altérées tout comme les liaisons glycosidiques entre le rhamnose et l'acide galacturonique. Par ailleurs, les estérifications (acétyle et méthylester) sont préservées.

En revanche dans le cas du traitement alcalin à froid, aucune étude des méthylations ou des acétylations n'est possible, la saponification ne préservant pas les estérifications.

Une fois extraite en solution aqueuse (à froid ou à chaud), les pectines sont précipitées et purifiées à l'alcool.

Ces dernières années, les protocoles d'extraction quantitative des pectines ont été optimisées par l'utilisation de prétraitements physiques de la matière végétale par l'utilisation de techniques telles que la pression, la sonication ou l'irradiation aux micro-ondes.[8]

L'extraction industrielle de la pectine se fait à partir des sous-produits de l'industrie des jus de fruits. Marcs de pommes et écorces d'agrumes sont les sources principales et abondantes de pectine en raison de leur richesse substances pectiques. Le procédé d'extraction est basé sur l'hydrolyse en milieu acide et chaud de la protopectine qui se transforme en acide pectinique. Le jus obtenu est traité par de l'isopropanol, afin de précipiter la pectine. Le coagulum, à l'aspect fibreux, est lavé, pressé, séché sous vide, puis broyé pour obtenir une poudre fine. Les réglages de la température, du pH et du temps de l'hydrolyse permettent de prédéterminer le DM de la pectine. Les pectines ainsi extraites, ont le plus souvent un DM compris entre 55 et 75 % (pectines HM). Leur masse moléculaire est généralement élevée. Les différentes étapes de la fabrication des pectines sont représentées sur la figure I-8.

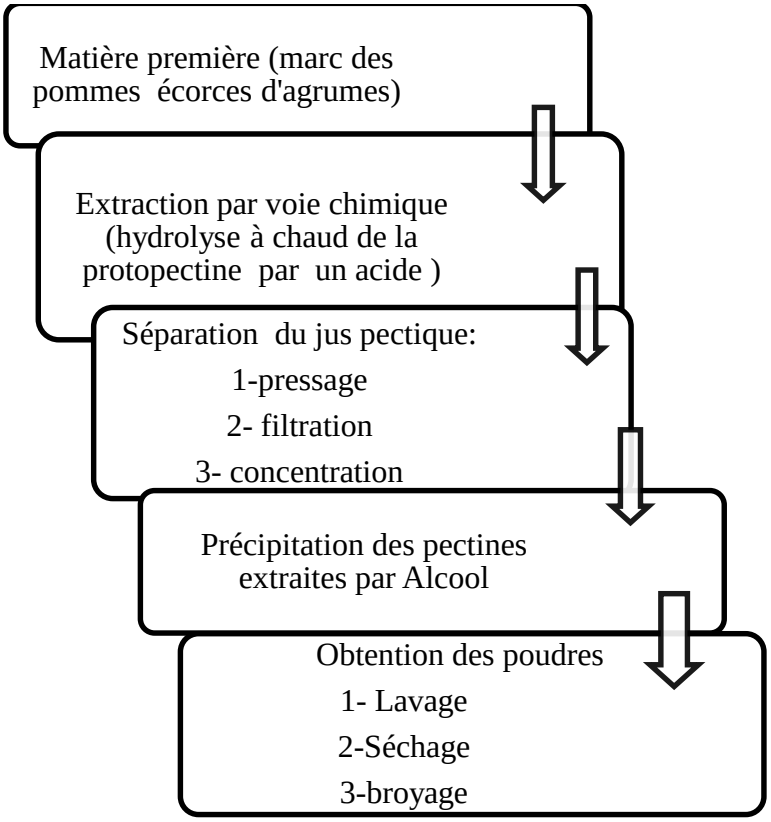


Figure (I-8) : Différentes étapes du procédé industriel d'extraction de pectine.

I.2.5. Propriétés des pectines :

A. Solubilité des pectines :

Les pectines se comportent comme des polyélectrolytes grâce à la présence des groupements carboxyliques dans leur squelette. La solubilité est déterminée par le pKa qui varie dans une gamme de valeurs constantes (2,9 - 3,2). La solubilité des pectines dépend de divers paramètres dont entre autres :

- ✓ Le solvant, sa nature et sa force ionique.
- ✓ La nature de la pectine et sa concentration.
- ✓ Le pH de la solution.
- ✓ La température de la solution.
- ✓ Les contre- ions d'autres polymères existants dans la solution.
- ✓ Le degré de polymérisation.
- ✓ L'ionisation des groupements carboxyles et leur distribution.

En général les pectines sont solubles en milieux aqueux (eau, solutions tampons à faible force ionique) comme le formamide, le dimethyl-formamide, et le glycérol .

B. Stabilité des pectines :

La stabilité maximale des pectines a lieu à pH 4.Pour des pH < 3 et à basse température, les groupements acétyles et méthyles sont déstabilisés et les sucres neutres sont hydroxylés. Si la température est élevée l'hydrolyse est accélérée. En milieu alcalin et à basse température les groupements esters sont saponifiés. En milieu neutre et à température ambiante la saponification est accompagnée de la réaction de dépolymérisation, cette dégradation a lieu uniquement dans les liaisons glycosides et dans les résidus méthylés de l'acide galacturonique. A des températures supérieures à 60° C, cette dégradation n'a lieu qu'à pH légèrement acide (pH proche de 5).

C. Propriétés gélifiantes :

Un gel est un réseau tridimensionnel de macromolécules incluant un solvant. Celui-ci est provoqué par des changements physiques ou chimiques qui tendent à diminuer la solubilité de la pectine, favorisant la formation de cristallisations locales. La gélification consiste en l'association des chaînes de polygalacturonate, par formation des zones de jonctions [35].

Les gels de pectines sont des gels physiques formés par association locale entre les chaînes macromoléculaires au niveau des zones de jonctions. La nature exacte de la zone de jonction dépend de la structure chimique des pectines et doit être d'une longueur minimale pour être

stable compte tenu des caractéristiques du milieu auxquels s'ajoutent les facteurs intrinsèques (masse moléculaire, charge, degré de substitution, teneur en acides galacturonique) et extrinsèques (température, pH, force ionique, nature des ions dans le milieu).

Le gel de pectine HM est un gel sucré et acide alors que le gel de pectine LM est principalement calcique, thermoréversible et thixotrope.

D. Propriétés viscosifiantes :

Cette propriété est obtenue quand les molécules modifient le comportement de la phase continue du fait de leur structure (PM/encombrement/…) sans pouvoir créer de zones de jonctions. Les pectines HM de haut poids moléculaire dans les milieux non propices à la gélification (ex : boisson fruitée) présentent cette propriété. En ce qui concerne les pectines LM, on parlera plutôt de comportement typiquement viscoélastique, dont chacune des composantes peut être modifiée en fonction, par exemple, de la teneur en calcium du milieu réactionnel.

I.2.6.Domaines d'applications des substances pectiques :

Au niveau industriel, elles sont utilisées comme additifs dans l'industrie textile et agro-alimentaire pour leurs propriétés stabilisantes, épaississantes et gélifiantes.

A. Industrie alimentaire :

L'aptitude de la pectine de former un gel avec du sucre est derrière son utilisation dans l'industrie alimentaire, en combinaison avec le sucre, comme agent épaississant pour :

- Améliorer la consistance des gelées et des confitures à base des fruits ou des produits laitiers.
- En confiserie dans les pâtes à fruits et confiseries gélifiées.
- Produits pour fourrage et décor (biscuiterie et pâtisserie) ; la pectine a pour rôle de limiter les migrations possibles de l'humidité d'une couche à une autre.
- Produits pauvres en matière sucrée (laits gélifiés, sauces de nappage ou de décors aux fruits pour crèmes glacés…).

Les pectines sont également employées comme stabilisateurs dans l'industrie laitière, car elles peuvent agir en tant qu'hydrocolloïde protecteur. La stabilisation de la protéine dans les boissons (pH = 4) est un domaine d'application de plus en plus important pour la pectine HM.

B. Industrie pharmaceutique :

Les pectines autant que fibres solubles forment des gels, et ralentissent ainsi la vidange gastrique et diminuent l'absorption de glucose. Ces fibres permettent de réguler la glycémie et l'insulinémie après leur ingestion et ont donc un effet positif sur le diabète [36]

De plus, par l'augmentation de la viscosité du bol digestif, les fibres solubles ont une capacité de rétention intestinale des acides biliaires. Cette rétention entraîne une augmentation de l'excrétion des acides biliaires issus de la dégradation du cholestérol par le foie, ce qui est suivi par une diminution du cholestérol circulant.

Il semble que la consommation de 2 à 10 g de fibres solubles par jour diminue de 13% le taux de LDL-cholestérol [37]. Les fibres ne sont pas digérées par l'organisme mais sont fermentées au niveau du colon par les bactéries du microbiote colique.

Par l'intermédiaire de cette fermentation, les fibres ont également un effet positif sur le cancer du côlon [38]. La fermentiscibilité des pectines n'est pas influencée par leur viscosité mais par leur structure chimique.

Les pectines faiblement méthylées sont fermentées plus rapidement que les pectines hautement méthylées. De plus, Cette fermentation entraîne la production de métabolites : les acides gras à courtes chaînes tels que le propionate, le butyrate, etc…. qui sont rapidement absorbés au niveau du côlon. Le butyrate est capable d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses et limite l'adhésion d'entéro-pathogènes.

Dans le sang, les pectines ont une action immunologique par l'activité de formation des anticorps et une action détoxifiante sur les métaux lourds (plomb).Elles ont par ailleurs, une action antidiabétique et anti vomitive. [39]

Dans des applications pharmaceutiques modernes, la pectine a beaucoup d'intérêt comme excipient pour des systèmes de la libération des médicaments. La libération du médicament du côlon peut être réalisée avec des formes galéniques contenant la pectine, seul ou en combinaison avec d'autres polymères. Le profil de libération du médicament peut être changé en fonction du degré d'estérification. La pectine a des propriétés bioadhésives, qui peuvent être exploitées pour la libération nasale. La pectine peut être formulée en solution, gel, ou un film et être employée en sirops, suspensions, pastilles, pâtes, comprimés et capsule.

C. Industrie cosmétique

Les propriétés de la pectine sont utilisées dans une variété d'applications personnelle de soin, y compris des produits de peau et de cheveux. Les gels de pectine peuvent être employés pour préparer des pâtes sans utilisation des agents tensioactifs.

Dans l'industrie cosmétique, la pectine est utilisée dans la fabrication des vernis, des huiles et des crèmes. Elle est aussi utilisée comme un agent épaississant et stabilisant dans les gels pour les cheveux, les lotions et le shampooing.

I.3. Les polyphénols :

I.3.1. Généralités :

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées [40]. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels que les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc. [41]

I.3.2. Définition :

Avant d'inclure les composés phénoliques de structure simple, les polyphénols par définition englobaient que les composés phénoliques solubles dans l'eau de poids moléculaires compris entre 500 et 4000 Da possédant 12-16 groupes phénoliques et 5-7 noyaux aromatiques par 1000 masse moléculaire relative et ayant des capacités spéciales comme la précipitation des protéines et les alcaloïdes.

De manière générale, les polyphénols sont des métabolites secondaires résultants biogénétiquement dans la plupart des espèces végétales. Ils sont de structures diverses regroupant des composés simples tels que les monomériques et des composés complexes polymériques [42]. Les composés polyphénoliques contribuent à diverses propriétés biologiques qui assurent un rôle protecteur de la santé humaine. Pour la plante, ils sont responsables d'une protection contre les stress biotiques et abiotiques, et ont un rôle organoleptique et visuel (pigmentation). [43]

I.3.3. Classes des Polyphénols :

Les polyphénols sont classés selon la complexité du squelette de base en considérant :

- le nombre d'arrangement des atomes de carbone.
- la nature de leur squelette carboné (le degré de modifications de ce squelette et les liaisons avec d'autres molécules)
- la longueur de la chaine aliphatique liée au noyau benzénique.

Les polyphénols sont très nombreux, plus de 8000 structures identifiées, ils sont des molécules organiques hydrosolubles ayant une capacité de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques [44], ils sont regroupés en 4catégories principales :[45 ;46]

- Les flavonoïdes
- Les non flavonoïdes voir les acides phénoliques.
- Les tannins
- Les lignines.

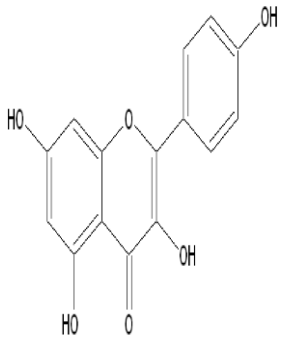
Ces différentes classes de polyphénols sont présentes à des concentrations variables dans les différentes parties de plantes,

I.3.3.1 les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, plus de 4000 molécules sont identifiées. Ce sont des pigments essentiels, responsables de la coloration des fleurs, fruits et feuilles [46 ;47]

Les flavonoïdes sont des composés complexes dont la structure renferme 15 atomes de carbones formant une structure C6-C3-C6 constituant deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle oxygéné [47]

Les flavonoïdes sont repartis en plusieurs classes dont les principales sont : les flavones, flavonols, flavan-3-ols, isoflavones, flavanones et anthocyanidines [44 ; 48] celles qui sont identifiées dans la courge sont les flavones et flavonols (figure I-9).



Kaempférol

Figure I-9 : structure de kaempférol identifiés dans la *Cucurbita maxima*

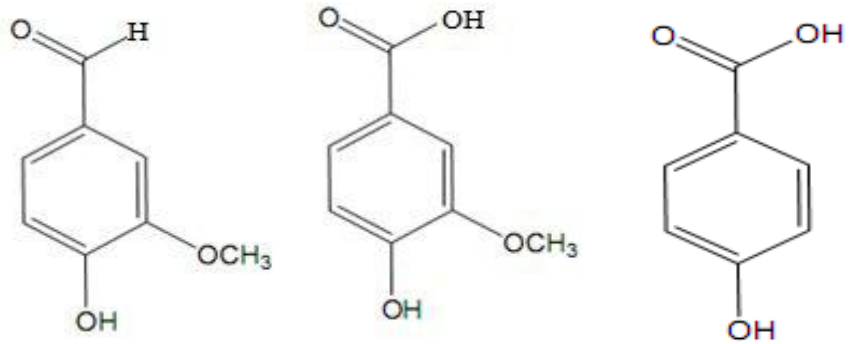
I.3.3.2 Acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont des composés organiques qui possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La dénomination acide phénolique est réservée aux dérivés des acides benzoïques (C6-C1) et cinnamiques (C6-C3).

Pericin *et al*. (2009), ont constaté que la courge renferme une quantité faible en acides phénoliques; 4µg/100g MF pour les acides vanillique et syringique, 5µg/100g MF pour l'acide ferulique, 10µg/100g MF pour l'acide caféique, 3µg/100g MF pour les acides coumarique, vanilline et ρ-hydroxybenzoïque.

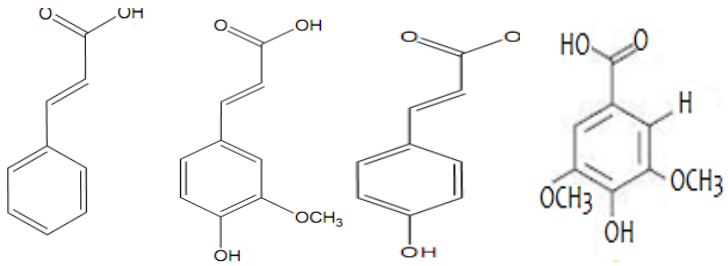
Les acides phénoliques sont repartis en deux groupes :

- **les acides hydroxybenzoïques :** dérivés de l'acide benzoïque, caractérisés par la présence d'un groupe carboxyle placé sur un phénol. La figure I-9 illustre la structure des acides hydroxybenzoïques identifiés dans l'écorce du *Cucurbita pepo.*
- **les acides hydroxycinnamiques :** dérivés de l'acide cinnamique, généralement ils sont sous forme d'esters [8]. Les acides hydroxycinnamiques identifiés dans la chair et l'écorce de la courge sont illustrés sur la figure I-10.



Vanilline Acide vanillique Acide ρ-hydroxybenzoïque

Figure I-10 : Structures des acides hydroxybenzoïques identifiés dans l'écorce de *Cucurbita pepo* [49].



Acide cinnamique Acide ferulique Acide ρ-coumarique Acide syringique

Figure I-11 : Structures des acides hydroxycinnamiques identifiés dans la *cucurbita.pepo.* [49]

I.3.3.3 Les tanins :

Les tanins sont des métabolites secondaires présents dans de nombreuses plantes ligneuses et herbacées, localisés dans les tiges, feuilles, fruits ou graines et dans les vacuoles cytoplasmiques des cellules périphériques qui sont situées au niveau de l'épiderme Deux groupes de tanins sont distingués :

- **tanins hydrolysables :** sont des esters (oligo ou polyesters) de sucres généralement le glucose et d'acides phénoliques ; acide gallique pour les tanins galliques ou acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation pour les tanins ellagique ; ils ont un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton [48]
- **tanins condensés :** Les tanins condensés ou proanthocyanidols sont des polymères flavaniques, constitués d'unités de flavan-3-ols avec un poids moléculaire très élevé le tableau I-5 illustre les teneurs en tanins dans les graines feuilles et la chaire de la courge .

Tableau I-5 : Les teneurs en tanins dans les graines feuilles et la chaire de la courge. [50,51]

Partie de plante	Provenance	Teneur en tannins
Feuille de *Cucurbita.Moshata*	Thailande	4.48 mgEAT/100g
Graines de *Telfaria Occidentalis Hook*	Sudan	228 mg EAT/100g
Chaire de *Telfaria Occidentalis Hook*	Niger	0.83 mgEAT/100g

II.1. Introduction :

Différents ordres de préoccupations confèrent à cette étude sa substance, dans un axe principal on a entrepris l'extraction des composés macromoléculaires d'intérêt qui existent dans les écorces de la courge musquée cultivée en Algérie. Leurs caractérisations ainsi que leurs pouvoirs biologiques ont été évalués pour accomplir l'objectif du deuxième axe de ce travail. Pour ce faire, une étude expérimentale ; réalisée au sein des laboratoires de biologie et de chimie de l'université de Médéa ; consiste en une :

- Extraction des substances pectiques à partir des écorces et des graines du fruit de la courge musquée par voie acide à chaud ainsi que par l'eau à chaud.
- Caractérisation physicochimique des pectines isolées.
- Extraction des polyphénols à partir de la même matière végétale choisie.
- Evaluation de la teneur des polyphénols contenus dans les écorces du fruit de cette plante.
- Evaluation du pouvoir antibactériens des pectines et des polyphénols obtenus.

Dans cette partie, on décrit tout le matériel et les produits utilisés ainsi que les différents modes opératoires suivis pour réaliser toutes les expériences de ce travail.

II.2. Produits et matériels :

Les différents produits ainsi les matériels utilisés lors de cette étude expérimentale, sont rassemblés dans le Tableau II.1.

Matériels	**Produits**
pH mètre	-Acétone
Balance	Acide sulfurique
Bain marie	Éthanol
Etuve	Rouge de phénol
Rota-évaporateur	Réactif de folin
pH-mètre	Hydroxyde de sodium
Centrifugeuse	
Spectrophotomètre FTIR	
Plaque chauffante.	
Spectrophotomètre FTIR-8400	
Spectrophotomètre UV-visible	
Agitateur magnétique	

II.3. Préparation du matériel végétal :

La matière végétale utilisée dans cette étude est les écorces de la variété de courge musquée appelée Butternut. Le fruit a été récolté en fin de maturation à Mostaganem, nord - est de l'Algérie. Les écorces et les graines qui ont été séparées de la chair du fruit sont bien lavées à l'eau de robinets, une partie des écorces séparées a été utilisé à l'état frais (figure II-1). Tandis que les graines et l'autre partie des écorces ont subi un séchage à l'air libre à température ambiante.

Une fois bien séchées, les graines et les écorces sont broyées en poudre à l'aide d'une moulinette électrique (figure II-2). Les poudres sont par la suite stockées dans des flacons à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

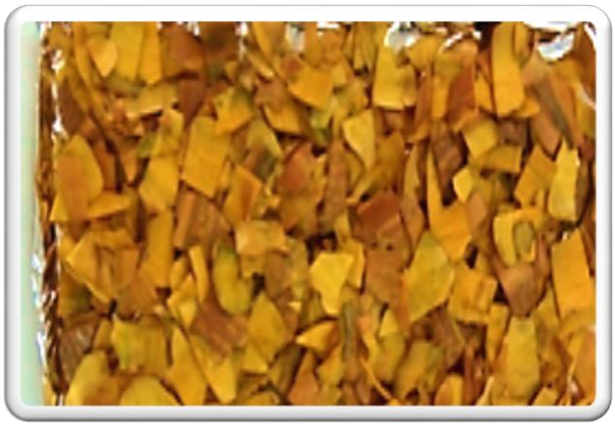


Figure II-1 : Ecorces fraiches du butternut.



Figure II-2 : A-Poudres des écorces du butternut, **B**-Poudres des graines du butternut.

II.3. Détermination de la teneur en eau :

La teneur en eau est déterminée comme étant la quantité d'eau en grammes contenue dans la matière végétale fraiche. La teneur en eau des écorces fraiches a été déterminée par le procédés d'élimination d'eau par le séchage de ces écorces dans une étuve à 60^0C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Le pourcentage en eau contenue dans la matière végétale est déterminé par la formule suivante :

$$T\% = [(m_f - m_i)/m_i] \times 100 \qquad \text{(II-1)}$$

T% : teneur en eau en %.

m_f : masse des écorces sèches du butternut.

m_i : masse initiale des écorces fraiches du butternut.

II.4. Extraction des substances pectiques :

II.4.1. Protocole expérimentale :

L'isolation des substances pectiques à partir des écorces de Butternut a été procédée par extraction par voie :

- ✓ Acide à chaud (H_2SO_4) décrite par
- ✓ Eau à chaud.

Une masse de poudre de matière végétale a été homogénéisée avec un rapport solide/ liquide de 1/5 dans une solution acide aqueuse de pH ajusté. Le mélange réactionnel a été maintenue à une température particulière 80°C dans un bain marie sous agitation pendant une durée bien déterminée.

A la sortie de bain-marie, la matière végétale épuisée a été séparée de la solution contenant le jus pectique par filtration à travers la gaze suivie par une centrifugation à 6000 tr/min pendant 10 minutes.

La pectine a été précipitée en ajoutant deux volumes d'éthanol (96%) à un volume de jus pectique (rapport volumique pectine /éthanol : 1/2). Après une nuit de repos, maintenue à la température ambiante, le précipité est filtré à travers un papier filtre puis lavé par l'éthanol. Finalement, le produit est séché dans l'étuve à 50°C. La pectine obtenue est broyée, pesée pour la conserver finalement dans des flacons bien fermés avant de procéder à son caractérisation.

Notons que l'extraction par l'eau à chaud se fait de la même manière décrite ci-dessous à part que l'acide sulfurique est remplacé par l'eau et dans ce cas le pH n'est pas ajusté.
Les principales étapes suivies dans l'extraction de la pectine sont résumées dans la figure II .3.

Les différentes conditions opératoires utilisées dans cette partie sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau II-1 : Conditions opératoires de l'extraction des pectines.

Matière végétale	**H_2SO_4 (T = 80°C)**		**Eau (T = 80 °C)**
	pH	t (min)	t (min)
Ecorces fraiches	1.25	60 90	
	1.67	60 90	
Ecorces sèches	1.25	90 120	120
	1.67	90	
graines sèches	1.67	90	

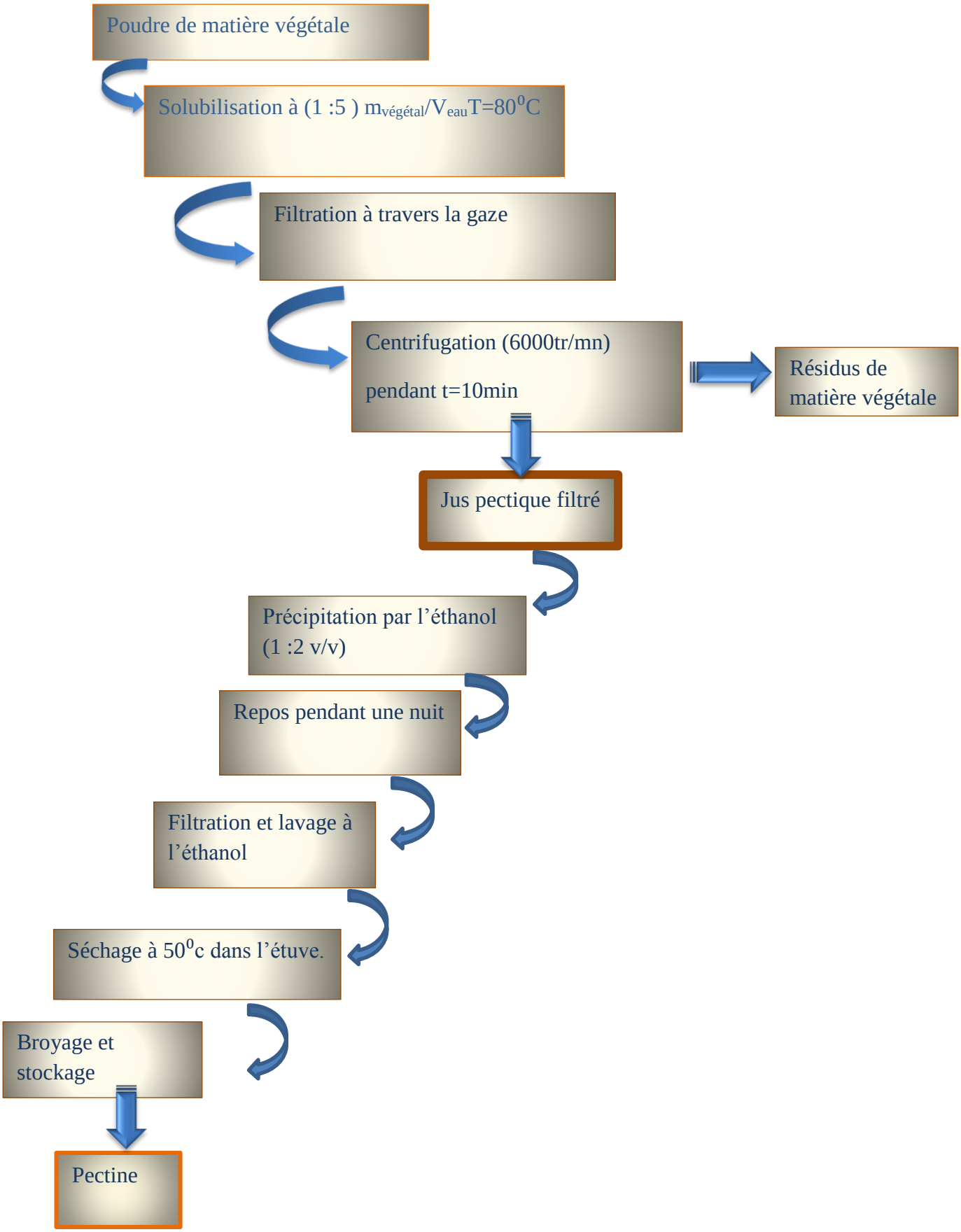


Figure II-3 : protocole expérimentale d'extraction des pectines

II.4.2.Calcul du rendement en pectine extraite :

Les rendements en pectines sont exprimés en pourcentage et ils ont été calculés par rapport à la masse initiale de la matière végétale sèche selon la relation suivante :

$$R(\%) = m/m_0 \times 100 \quad \textbf{(II .1)}$$

m est la masse de la pectine extraite (g),

m_0 est la masse de l'échantillon traité (g).

II.4.3. Analyse et caractérisation physicochimique des pectines extraites :

II.4.3.1. Test organoleptique :

La couleur de la pectine extraite a été identifiée par observation visuelle.

II.4.3.2. Solubilité de la pectine :

[52]

Une quantité (0,1 g) de la pectine sèche a été initialement mise en contact avec 5ml d'éthanol (95%) Le mélange a été agité pour former une suspension qui est par la suite chauffée à T= 45^0C pendant 15 minutes. La masse de pectine non dissoute est relevée pour déterminer la solubilité (masse de pectine complètement dissoute estimée dans 1ml de solution).

II.4.3.3. Détermination du poids équivalent (PE) :

Le poids équivalent a été déterminé selon la méthode de Ranganna [53], un échantillon de pectine (0,25 g) a été pesé dans un flacon conique de 250 ml ; à laquelle on ajoute 5 ml d'éthanol, 0,5 g de chlorure de sodium et 100 ml d'eau distillée. Le mélange a été vigoureusement secoué et 3 gouttes de rouge de phénol ont été ajoutées et la solution a été titrée par du NaOH 0,1 N jusqu'à une couleur pourpre au point final. Cette solution de neutralisation a été stockée pour la détermination de la teneur en méthoxyle.

Le Poids équivalent est donné par la relation suivante:

$$\text{Poids équivalent} = (m_{pect} \times 1000) / V_{NaOH} \times N_{NaOH} \quad \textbf{(II .2)}$$

m_{pect} : masse de l'échantillon de pectine.

II.4.3.4. Détermination de la teneur en méthoxyle (MeO%) :

La détermination de la teneur en méthoxyle a été réalisée en utilisant la méthode de Ranganna [53]. A la solution neutre obtenue précédemment (détermination du EqW), on ajoute 12,5 ml de NaOH 0,25N, après une agitation soigneuse de la solution à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite 12,5 ml de HCl 0,25 ont été ajouté avant de titrer la solution a été avec du NaOH 0,1N.

la teneur en méthoxyle est calculée comme suit :

Teneur en méthoxyl (%) = (V_{NaOH} x N_{NaOH})3.1/ m_{pect} **(II-3)**

II.4.3.5. Détermination leurs en acide anhydrouronique total (AUA) :

L'AUA total de la pectine a été obtenu par la la formule suivante [54]

AUA(%) = 176 x100 (0.1 Z- 0.1 Y) / m_{pect} **(II-4)**

Avec :

Une unité moléculaire d'AUA (1 unité) = 176 g

Z : Titre de NaOH (ml), obtenu à partir de la détermination du poids équivalent

Y : Titre de NaOH (ml), obtenu à partir de la détermination de la teneur en méthoxyle

II.4.3.6. Détermination du degré d'estérification (DE) :

Le degré d'estérification des pectines est déterminé par la méthode titrimétrique. Un échantillon de pectine (250mg) a été transféré dans un erlenmeyer de 250 ml, humidifié avec 2 ml d'éthanol et dissous dans 100 ml d'eau distillée. Après la dissolution complète, 5 gouttes de phénophtaléine ont été ajoutées, et la solution a été titrée avec NaOH (0.5M), le résultat est enregistré comme titre initial. Puis, 10 ml de NaOH (0.5M) a été ajouté, et le mélange a été agité vigoureusement, et laissé reposer 15 min. A ce dernier mélange, 10 ml d'HCl (0.5M) a été ajouté et il a été agité jusqu'à disparition de la couleur rose. Cinq gouttes de phénophtaléine ont été ajoutées et la solution est titrée avec NaOH (0.5M) jusqu'à l'apparition d'une couleur rose clair. Ce volume de titrage est enregistré comme le titre final [55].

.

Le degré d'estérification (DE) est calculé à partir de la formule suivante :

DE (%)= [Titre final / (Titre initial + titre final)] × 100 **(II-5)**

II.4.3.7. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier :

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FTIR) se base sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. A travers les transitions possibles entre les états vibrationnels et réactionnels d'une molécule, l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau peut facilement s'effectuer en se basant sur la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques.

Ayant l'avantage de sa simplicité et la nécessité de petites quantités d'échantillon à analyser la rend une méthode physique d'analyse très utilisée.

Les fonctions acides carboxyliques galacturoniques permettent d'indiquer la présence des molécules pectiques.[56]

Dans notre travail les analyses FTIR ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre type Vertex70 (Brucker). L'échantillon à analyser (pectine en poudre) est déposé directement sur une petite cuve puis analyser. Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 400 et 4000 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1} et un nombre de scanne égale à 20.

II.5. Extraction et quantification des composés polyphénoliques :

Les composés phénoliques ont été reconnus comme agents antioxydants, qui ralentissent la dégradation due aux effets de l'oxydation. Ceci a attribué une grande valeur ajoutée à ce type de substances.

Dans cette partie, nous avons procédé à l'extraction et le dosage des composés phénoliques à partir des poudres d'écorces sèches de Cucurbita. moschata (Butternut).

II.5.1 Extraction des polyphénols totaux :

Pour ce faire on a adopté la méthode décrite par Marie-JosBphe Amiot et *al*., (1986) [57] avec quelques modifications.

Une masse du broyat des écorces séchées a été imprégnée dans un mélange de 60%(v/v) (éthanol / eau) avec un rapport 1:5 (m/v). Le milieu réactionnel a été maintenu à une température de 80°C dans un bain marie pendant 15 min.

L'extrait est filtré pour éliminer le résidu (poudre des écorces épuisée) à travers la gaze en premier lieu, ensuite une deuxième filtration à l'aide d'un papier filtre. L'extrait organique ainsi obtenu est évaporé à l'aide d'un rota-évaporateur pour éliminer le solvant. Par la suite, les substances polyphénoliques ainsi obtenues sont pesées pour déterminer le rendement en polyphénols totaux extractibles dans la masse végétale. Le résidu est repris dans 10 ml de l'éthanol pur et conservé à 5°C donnant l'extrait phénolique purifié qui va servir à l'évaluation du pouvoir antibactérien.

Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect visqueux de couleur marron jaunâtre clair.

II.5.1 Dosage des polyphénols totaux :

Les teneurs en composés phénoliques totaux dans l'extrait éthanoïque ont été évaluées suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu comme décrite dans la littérature [58]
En milieu basique, le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de réduction de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. La concentration massique des constituants utilisés dans la préparation des réactifs, doit être optimisée pour obtenir la réponse analytique la plus linéaire possible en respectant le rapport réactifs/polyphénols totaux.

Un volume de 0,2 ml d'extrait dilué 200 fois a été ajouté à 1ml de la solution de Folin-Ciacalteu puis mis dans un Erlen Meyer. Ce mélange a été laissé au repos à température ambiante pendant 5 min avant l'addition de 0.8 ml d'une solution de carbonate de sodium (75 g/L). Après 20minutes d'incubation à l'obscurité à 40°C, les absorbances ont été mesurées à 760 nm contre le blanc (cuve remplie de 2ml du FCR et de carbonate de sodium dans l'eau distillée) en utilisant un spectromètre UV visible.
Une courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à des concentrations allant de 0 à 600 µg/ml pour le calcul du rendement en polyphénols présents dans la matière végétale sèche. Les teneurs en PPT sont exprimées en équivalent d'acide gallique (milligrammes équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche). L'équation de cette courbe d'étalonnage est de la forme :

$$[PPT] = (C \times F_d \times V)/m \qquad \textbf{(II-6)}$$

Avec :
[PPT] : la concentration des polyphénols totaux en mg EAG/g de matière végétale sèche.
C : la concentration obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en mg EAG/ml ;
F_d : le facteur de dilution
V : le volume total du solvant d'extraction (ml)
m : la masse initial de la matière utilisé (g).

II.6.Evaluation du pouvoir antibactérien :

Dans ce volet de travail, on a fait appel à la méthode qualitative d'aromatogramme pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne qui consiste à estimer le pouvoir d'inhibition de la croissance des micro-organismes en présence des composés phénoliques issues des écorces séches de la courge musquée étudiée dans ce travail. La méthode décrite par Vincent, (1991) [59]; Kavbouche et al., (2005) [60] ; Ormeno et al., (2005) [61].

Pour ces tests, plusieurs types de souches bactériennes ont été utilisés, elles proviennent toutes de différents prélèvements cliniques : *Streptocoque ; Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus ; Klebsiella oxitoca ;Entérocoque ; Escherichia coli,* ces bactéries sont largement rencontrées dans divers pathologies.

II.6.1.Préparation des échantillons :

Le test de l'activité antibactérienne des composés polyphénoliques extraits a été mis en point avec des doses décroissantes séparément (tableau II-2) et cela pour illustrer l'action (dose-dépendante) de ces composés d'intérêt testés sur la croissance des germes.

Tableau II-2 : Différentes concentrations utilisées pour le test antibactérien.

	C_0 (g/ml)	C_1 (g/ml)	C_2 (g/ml)	C_3 (g/ml)	C_4 (g/ml)	C_5 (g/ml)
Composés phénoliques	1.2×10^{-2}	2.4×10^{-3}	1.2×10^{-3}	8×10^{-4}	6×10^{-4}	1.2×10^{-5}

II.6.2. Mode opératoire :

On utilise la méthode de diffusion en milieu liquide ou gélosé, appelée aussi méthode Pasteur rapportée par [62]. Elle est dite qualitative car elle permet d'identifier l'existence ou non d'une éventuelle propriété bactéricide.

Elle consiste tout simplement à déposer des disques de papier Whatman (diamètre= 6mm) imprégnés d'extrait sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier, chaque extrait diffuse du disque et il s'établit donc dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque, après 48 heures d'incubation à 37°C, les bactéries se colonisent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'agents antibactériens

suffisante pour inhiber leur croissance. Il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque ce qui permet de mesurer le diamètre d'inhibition D en (mm).

II.6.3. Lecture des résultats :

Les résultats de l'activité antibactérienne peuvent être lus selon l'échelle donnée par Mutai et al (2009) [63] qui ont classé les diamètres d'inhibition selon cinq niveaux d'activité :

- $D < 10$ mm, l'activité inhibitrice est considérée nulle (-),
- $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm l'activité inhibitrice est considérée légère.
- $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm l'activité inhibitrice est considérée intermédiaire.
- $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm l'activité inhibitrice est forte.
- $D \geq 29$ mm très forte activité inhibitrice.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne peut être calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (D \text{ test} / D \text{ contrôle}) \times 100 \quad \textbf{(II-7)}$$

Cette partie recouvre la synthèse et l'examen des principaux résultats issus du travail expérimental entrepris dans cette étude concernant l'extraction, la caractérisation et l'évaluation du pouvoir bioactif des biomolécules extraites (polyphénols) de la courge musquée.

III.1. Teneur en eau de la matière végétale :

La quantité d'eau contenue dans les écorces fraiches de la courge musquée étudiée constitue 84.34% (figure III-1). Ce résultat montre que l'eau occupe une très importante fraction dans les écorces, tandis qu'elle n'excède pas 5.6% dans les graines de courge dans un travail de Fedha et al. (2010). [64]

Ramachandran et al (2017) [8] ont reporté une teneur en eau de 82.58% du poids total du fruit de Cucurbita.moschata provenant de l'Inde. Ce résultat est comparable avec les valeurs trouvées dans d'autres travaux Bhat et al (2013) [65], Muzaffer et al (2016) [66] pour la même espèce de plante.

Ces variations sont probablement expliquées par les différentes variétés et les espèces analysées, l'origine géographique et le stockage, car une conservation prolongée provoque la déshydratation du fruit (courge).

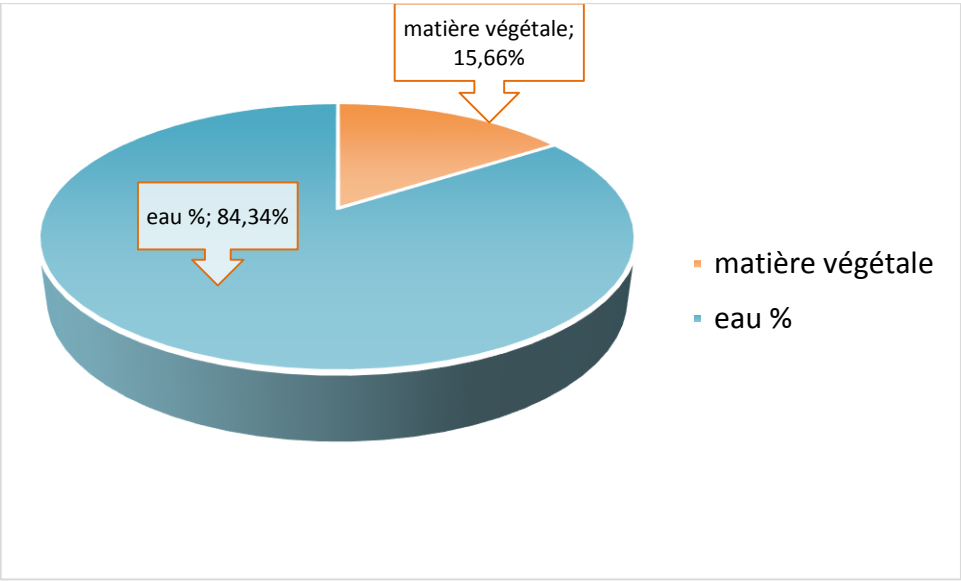


Figure III-1 : Teneur en eau des écorces de courge musquée (butternut).

III.2. Caractérisation des substances pectiques :

III.2.1. Aspect :

Les pectines issues des écorces de courge musquée ont une couleur marron jaunâtre tandis que celles extraites à partir des graines ont une couleur plus clair qui tend vers le beige (figure III-2). Cependant, une couleur marron pour des pectines extraites à partir des écorces de citrouille a été reporté par Charity U. et al (2016) [67].

Notons, que selon la matière première végétale utilisée, les pectines extraites peuvent être préalablement dépigmentée sur charbon actif ou sur résine de type C-18 avant la précipitation et la purification alcoolique (Brillouet,1998) [68]. Les facteurs comme la contamination de surface, le matériel agricole utilisé et l'erreur humaine peuvent avoir contribué à la variation de la couleur. Aina et al.(2012) [52].

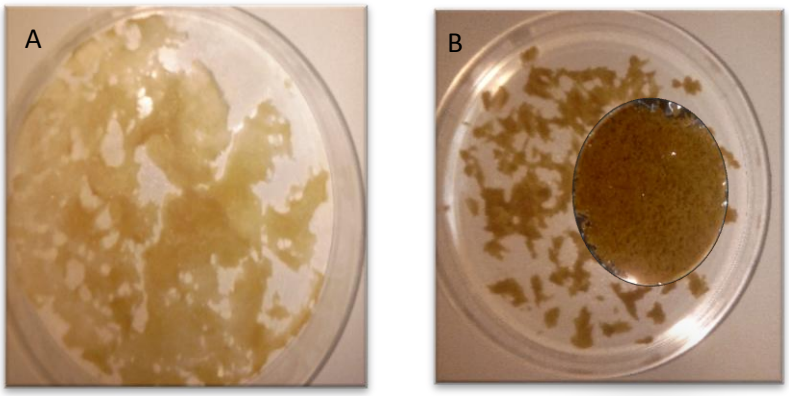


Figure III-2 : Echantillons de pectine extraite de courge musquée à partir **:**

A- graines, **B-** écorces.

III.2.2. Rendement en pectines :

L'examen des résultats représentés sur les figures III.3, III-4 et III-5 des rendements en pectines extraites aux différentes conditions opératoires indiquées précédemment sur le tableau II-1 a permis de noter que :

Les rendements en pectines extraites des différentes organes (graines, écorces) du fruit de la courge musquée variant de 3,95% à 10,76%. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux rapportés par Ramanchandran et al (2017) [8] qui a enregistré un rendement maximal de 6.32% pour la courge musquée.

Le rendement maximale (10,76%) est obtenu à partir des graines sèches par extraction pendant 120 min en milieu acide (pH= 1,25) et à T=80^{0}C.

Par rapport à d'autre espèces de la même famille le Cucurbita.moschata a manifesté une richesse en pectine, des rendements en pectine de 5% [69], 8-20% [70]et 5-7% [71] pour les 3 espèces de la famille des cucurbitacées : le C.maxima, le C.moschata et le C.pepo respectivement.

La quantité de pectine extraite dépend nettement de la partie de plante, la teneur en eau de la matière végétale. La méthode d'extraction et des conditions opératoires tel que le pH, le temps d'extraction,

La quantité des pectines des écorces fraiches dépasse 10%, cette quantité peut diminuer avec le séchage des écorces pour atteindre 6.73% pour les écorces sèches figure III-3.

Il est facile à remarquer que les quantités de pectine contenues dans les écorces sont plus importantes par rapport à celle localisée dans les graines. A t=90min les rendements obtenus à partir des écorces (fraiches et sèches) sont bien supérieurs à ceux issus des graines sèches et font une part de témoignage de la distribution non uniforme des substances pectiques au sein du même fruit. (figure III-3)

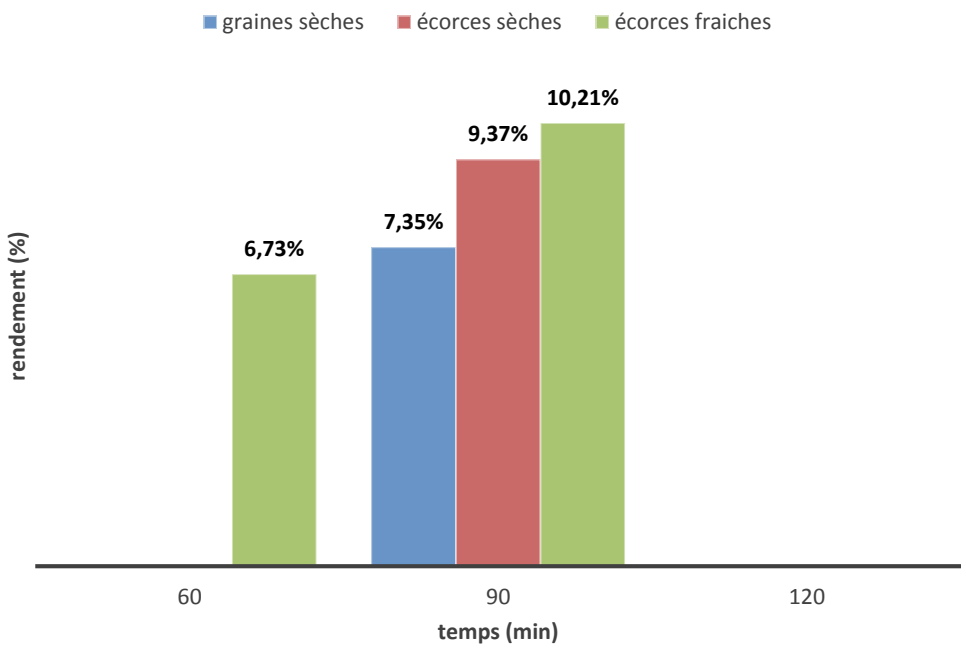


Figure III.3 : Rendement en pectines extraites des différentes parties du fruit de la courge musquée (Butternut) par H_2SO_4 à différents temps d'extraction (T=80^{0}C , pH=1.67).

Le traitement pendant un temps de 2h de la matière végétale par l'acide H_2SO_4 à chaud ($T=80^0C$) favorise l'extraction des pectines. Dans ces conditions le rendement atteint 10,73% à partir des graines sèches à pH=1,25.

Le rendement passe de 6,73% à 10,21% en prolongeant le temps de 60 min à 90 min pour les écorces fraiches.

En revanche, une dégradation thermique de la pectine, Ramanchandran et al (2017) [8] dans son étude concernant l'extraction des pectines par autoclavage sous pression, a remarqué une forte diminution de rendement en pectine pour une durée d'extraction dépassant un temps de 20min, la même remarque a été relevé par Chandel et al(2016). [72].

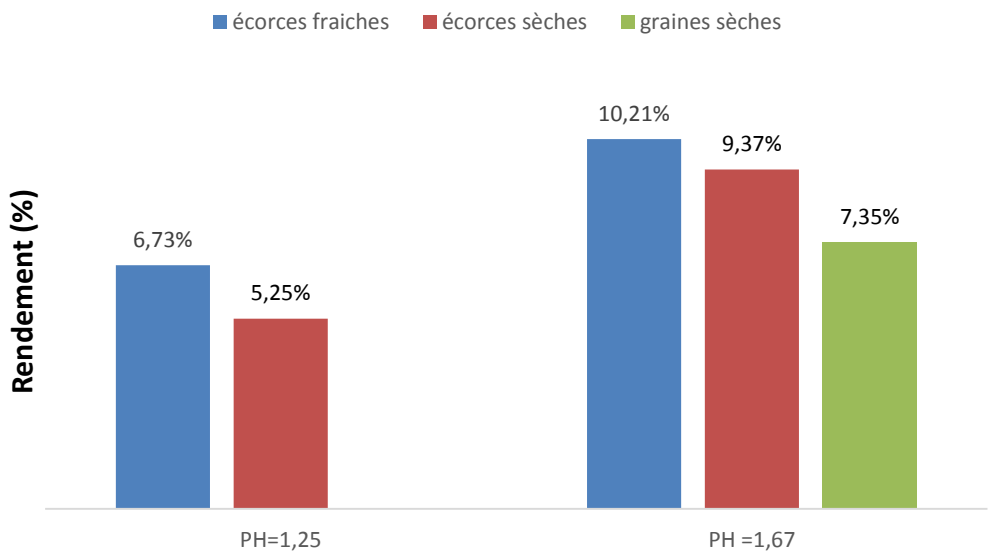


Figure III.4 : Rendement en pectines extraites des différentes parties du fruit de la courge musquée (butternut) par H_2SO_4 à différents pH ($T=80^oC$, t=90min).

Il est à noter que l'acidité du milieu réactionnel lors de l'extraction par H_2SO_4 des pectines marque son effet, plus le milieu est acide plus le rendement diminue. La figure III-4 montre que pour une diminution de pH de 1 ,67 à 1,25 ; le rendement en pectine extraite des écorces de la courge musquée (Butternut) décroit de 10,21% à 6,73% pour les écorces fraiches tandis que pour celle séchées, il diminue de 9,37% à 5,25%.

En revanche, Song et al (2012) [52] ont remarqué par l'extraction par micro-onde l'augmentation du pH de 1 à 2 a fait diminué le rendement en pectine de la chair du Cucurbita.maxima de 5,07%-1 ,09%.

Le traitement de la matière végétale avec de l'eau à chaud n'est pas assez favorable en termes de rendement en pectine extraite. Les résultats représentés sur la figure III-5 illustrent qu'un traitement à l'eau chaude peut aboutir à l'extraction de 3,95% de pectine qui ne représente qu'une fraction de 36% de la quantité des pectines extraite par utilisation de l'acide (H_2SO_4à pH=1.25).

Le traitement pendant un temps de 2h de la matière végétale par l'acide H_2SO_4 à chaud (T=80^{0}C) favorise l'extraction des pectines. Dans ces conditions le rendement atteint 10,73% à partir des écorces sèches à pH=1,25.

Pour l'utilisation de l'eau comme solvant, le rendement en pectine trouvé dans notre étude est en cohérence avec le rendement trouvé par Ramachandran et al(2017) [8] qui ont trouvé un rendement en pectine de 3.56% en utilisant l'extraction à l'eau chaude à (T=80°C, t=120min).

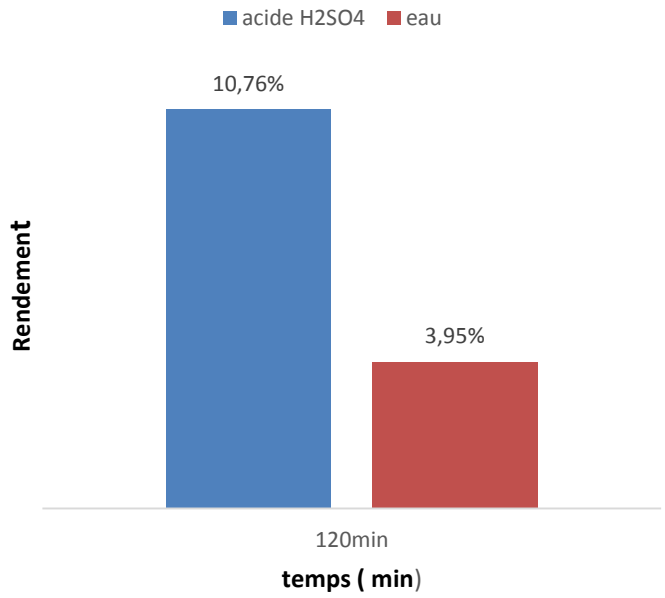


Figure III.5 : Rendements en pectines extraites des écorces sèches du fruit de la courge musquée (Butternut) par H_2SO_4 pH=1.25 et par l'eau (T=80^{0}C, t=120min,).

III.1.3. Solubilité de la pectine dans l'eau :

Les résultats relatifs au test de solubilité des pectines dans l'eau froide et chaude sont donnés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Résultats du test de solubilité des pectines extraites

Origine de pectine	Conditions d'extraction				
	H_2SO_4 (T = 80°C)		**Eau (T=80 °C)**		
	pH	t (min)	t (min)	Solubilité (S) dans l'eau à 40°C (mg de pectine / ml eau)	
Ecorces fraiches	1,25	60		**$2,8 \times 10^{-3}$**	
		90		**$2,01 \times 10^{-3}$**	
	1,67	60		**$2,1 \times 10^{-3}$**	
		90		**$2,4 \times 10^{-3}$**	
Ecorces sèches	1,25	90	120	**$2,3 \times 10^{-3}$**	
	1,25	120		**$1,73 \times 10^{-3}$**	**$1,63 \times 10^{-3}$**
	1,67	90		**$1,6 \times 10^{-3}$**	
graines sèches	1,67	90		**$1,6 \times 10^{-3}$**	

Les résultats obtenus montrent que les pectines obtenus des écorces (fraiches et sèches) et les graines de la courge musquée sont des substances hydrosolubles. Les écorces fraiches donnent des pectines de solubilités meilleures que celles des écorces sèches et des graines.

III.1.4. Poids équivalents

Les résultats de la détermination du poids équivalents des pectines extraites sont donnés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Poids équivalents des pectines

Origine de pectine	Conditions d'extraction				
	H_2SO_4 (T = 80°C)		**Eau (T=80 °C)**		
	pH	t (min)	t (min)	Poids équivalent (mg/mole)	Degré d'estérification
Ecorces fraiches	1,25	60		**445,71**	**87%**
		90		**625**	**86%**
	1,67	60		**1040**	**91%**
		90		**568,18**	**87%**
Ecorces sèches	1,67	90	120	**1086,96**	**90%**
	1,25	120		**164,47** **3125**	**83%** **94%**
	1,25	90		**520,83**	**86%**
graines sèches	1,67	90		**694,44**	**88%**

Les résultats obtenus (tableau III.2) montrent que les pectines extraites ont des poids équivalents de l'ordre de 164,47 - 3125 mg/mol. Pour la même espèce de plante Ramachadran et al (2017) [8] donne des poids équivalents entre 854- 616 g/mole.

Rehman Salariya (2005) [73] ont enregistrés des valeurs entre 783 et 1044 mg/mol pour la pectine de citron.

L'examen des résultats montre que le poids équivalent est affecté par la nature de l'extraction et la partie de la plante utilisée. L'extraction par l'eau permet d'avoir une pectine d'un haut poids équivalent allant jusqu'à 3125 mg/mole, cela peut être expliqué par le fait que par l'eau on peut extraire la pectine sans la dépolymériser.

En effet, le poids équivalent élevé pourrait être attribué selon Charity U. et al (2016) [67].à une faible dégradation partielle de la pectine, à la nature du processus d'extraction ou encore à la quantité d'acide libre.

Ainsi, le poids équivalent des pectines est inversement proportionnel à l'acidité de ces dernières. Plus le poids équivalent augmente, plus l'acidité de la pectine est faible, c'est-à-dire le contenu de cette dernière en groupements COOH est faible.

III.1.5. Degré d'estérification :

. Les résultats des mesures de DE donnés dans le tableau III.2 montrent que les pectines extraites à partir des graines de courge musquée possèdent des DE bien supérieurs à 50% allant de 83% jusqu'à 94%. Ces valeurs confèrent aux pectines extraites le classement en pectines hautement méthylées.

Les degrés d'estérification trouvés dans cette étude dépassent ceux rapportée dans la littérature : Ramachadran et al (2017) [8] donnent un DE de 69,81%, Nawriska et al(2013) [11] ont enregistré un DE de 53-56%.

III.1.6. Teneur en méthoxyle : (MeO%) :

Les pourcentages de teneur en méthoxyle déterminés pour les pectines extraites par H_2SO_4 aux différentes conditions opératoires sont représentés sur les figures III-6 (a) et (b) .

Il est clair que ces valeurs élevées en teneur en méthoxyle font preuve que les pectines extraites sont des hautement méthylées. Ceci est bien en concordance avec les valeurs enregistrées de DE (tableau III-2). Ces valeurs sont plus supérieures que celle trouvées par Ramachadran et al (2017)[8]

La teneur en méthoxyles de la pectine extraite des écorces sèches par l'eau atteint 16,86%. La pectine extraite des graines possède le plus faible MeO% de 14,38%

Les résultats trouvés indiquent qu'à PH=1,25, une prolongation du temps d'extraction résulte une diminution de la teneur en méthoxyles. La même remarque a été relevé par Kulkami et al (2010) [74] , Chandel et al (2016) [73].

Les teneurs en méthoxyles trouvés confirment que la pectine des écorces de courges musquée est favorable pour la formation des gels en présence des sucres.

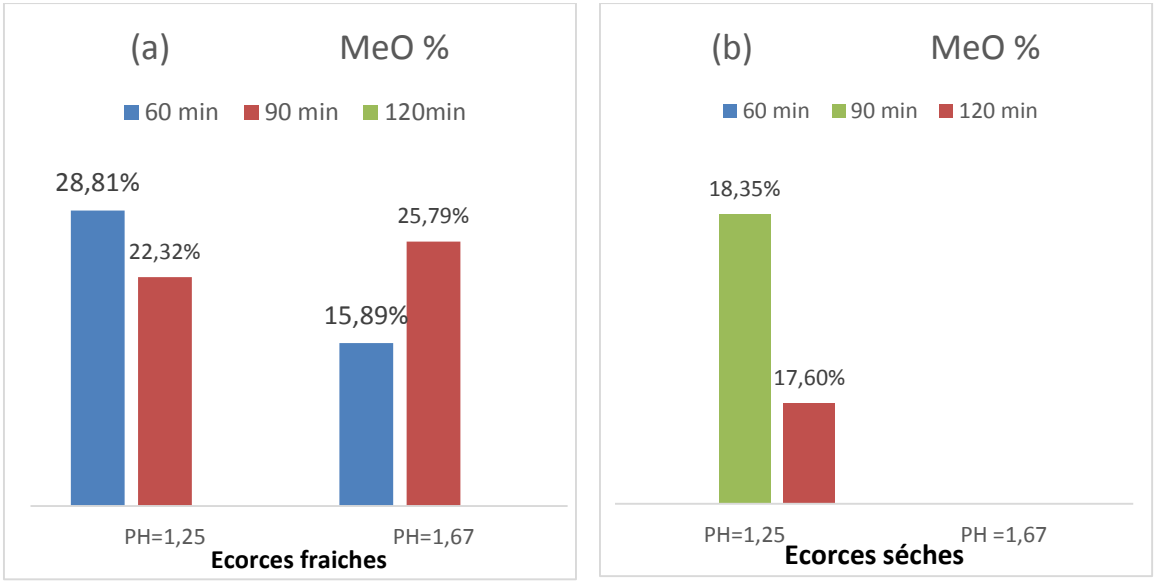


Figure III.6 : Teneurs en méthoxyles des pectines extraites des écorces du fruit de la courge musquée (Butternut) par H_2SO_4 ($T=80^0C$).

III.1.7. Spectroscopie FTIR :

Les spectres FTIR de pectines extraites à partir des écorces séches et des graines séches de la courge musquée sont représentés sur les figures III-7, III-8, III-9, III-10. Tous ces spectres FTIR marquent les principaux pics typiques correspondant à des groupements spéciaux dans les régions de nombre d'ondes suivantes :

- 3200-3600 cm^{-1} une bande large correspondant à la vibration du groupe OH.
- Deux bandes intenses autours de 2930 cm^{-1} et 2830 cm^{-1} correspondent aux vibrations des groupes C-H (CH_3 et CH_2).
- 1500 -2000 cm^{-1} correspond aux groupements C=O, une bande plus forte se produisant à 1696, 1729, 1711cm^{-1} pour les esters (COO-R) et 1571, 1663, 1664, une faible bande pour les ions carboxyles (COO-).

- 1250-600 cm^{-1} qui est une région d'emprunte de pectine montre des pics au tour de 1460 cm^{-1} 1360 cm^{-1}, 1140 cm^{-1} 1070 cm^{-1}, 1050 cm^{-1} indiquent la présence des liaisons - glycosidiques caractéristiques des substances pectiques.

A travers l'examen de ces figures, on peut noter que la similitude est plus en moins appréciable en termes de qualité des groupements caractéristiques des pectines, la différence consiste en leurs teneurs.

L'intensité relative entre les groupements esters (COOR) et les ions carboxyliques (COO-) dans les spectres manifeste une variabilité avec les conditions opératoires ce qui explique la variation du DE, elle est plus importante dans le cas du spectre de la pectine extraite :

- par l'eau ce qui explique une valeur élevée de DE par rapport à celle extraite par acide (figure III- 7).
- à pH=1,67 résultant un DE plus élevé par rapport à celui du pH=1,25. (figure III-8)
- A partir des graines sèches par rapport aux écorces sèches. (figure III-9)
- à t=120 min ce qui résulte un DE plus élevé que celui du 90min. (figure III-10).

Cette évolution de DE concorde bien avec les valeurs de DE trouvés auparavant par la méthode de titrimétrie.

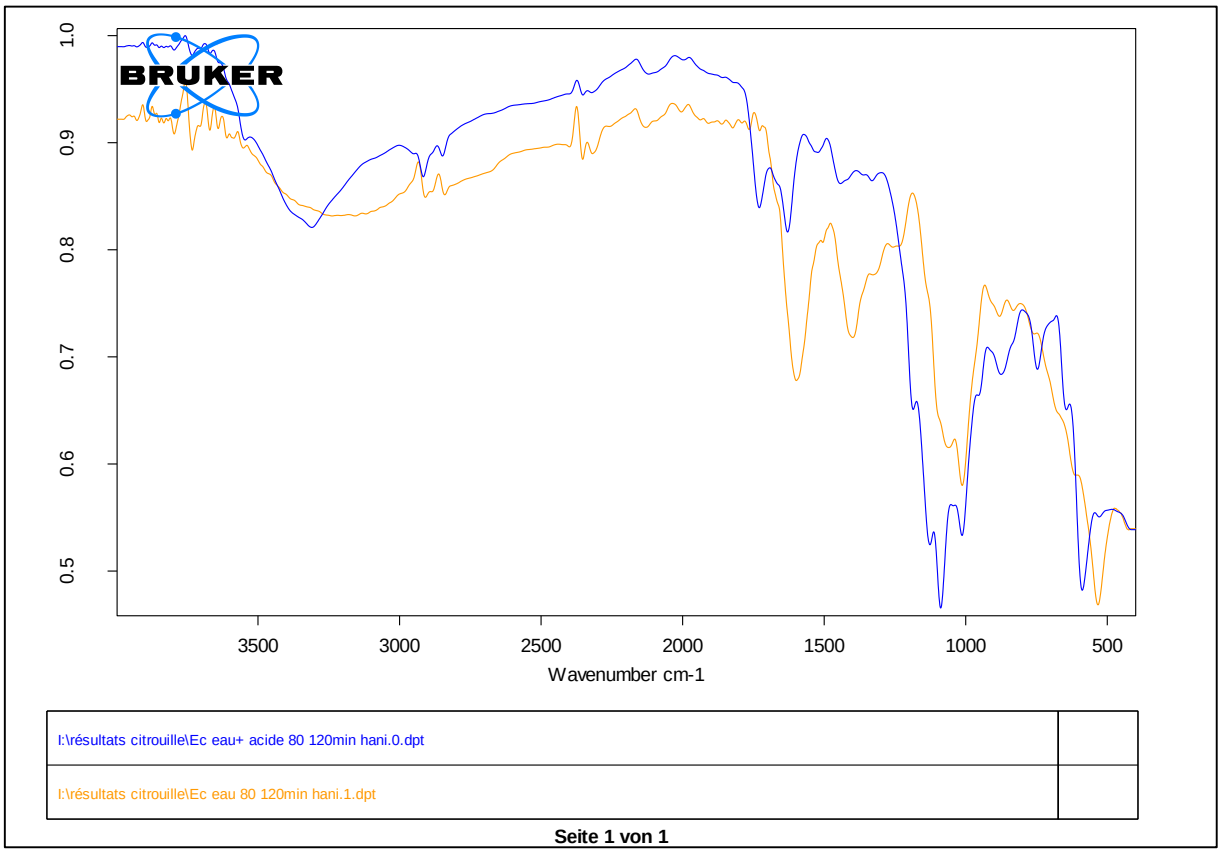


Figure III-7 : spectre FTIR de la pectine extraite des écorces sèches de courge musquée (t=120min T=80°C) :___ eau, ___ acide.

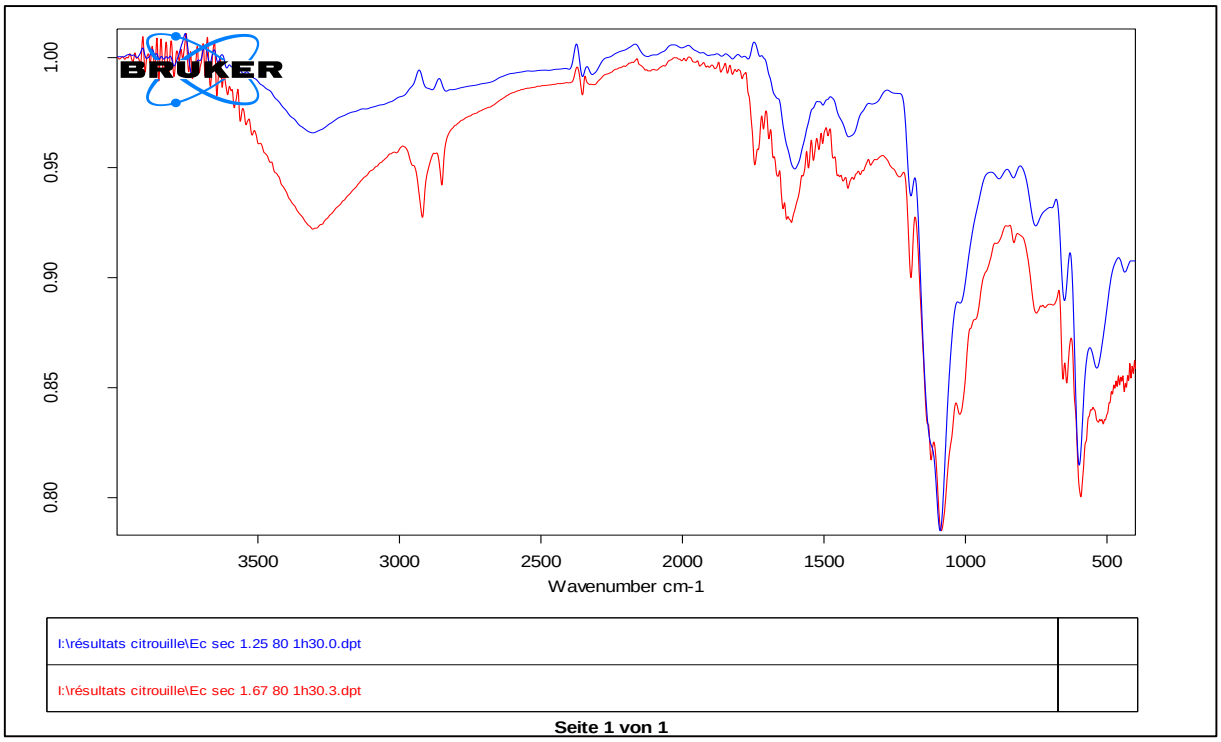


Figure III-8 : spectre FTIR de la pectine extraite des écorces sèches de courge musquée (t=90min T=80°C) :___ 1.67, ___ 1.25.

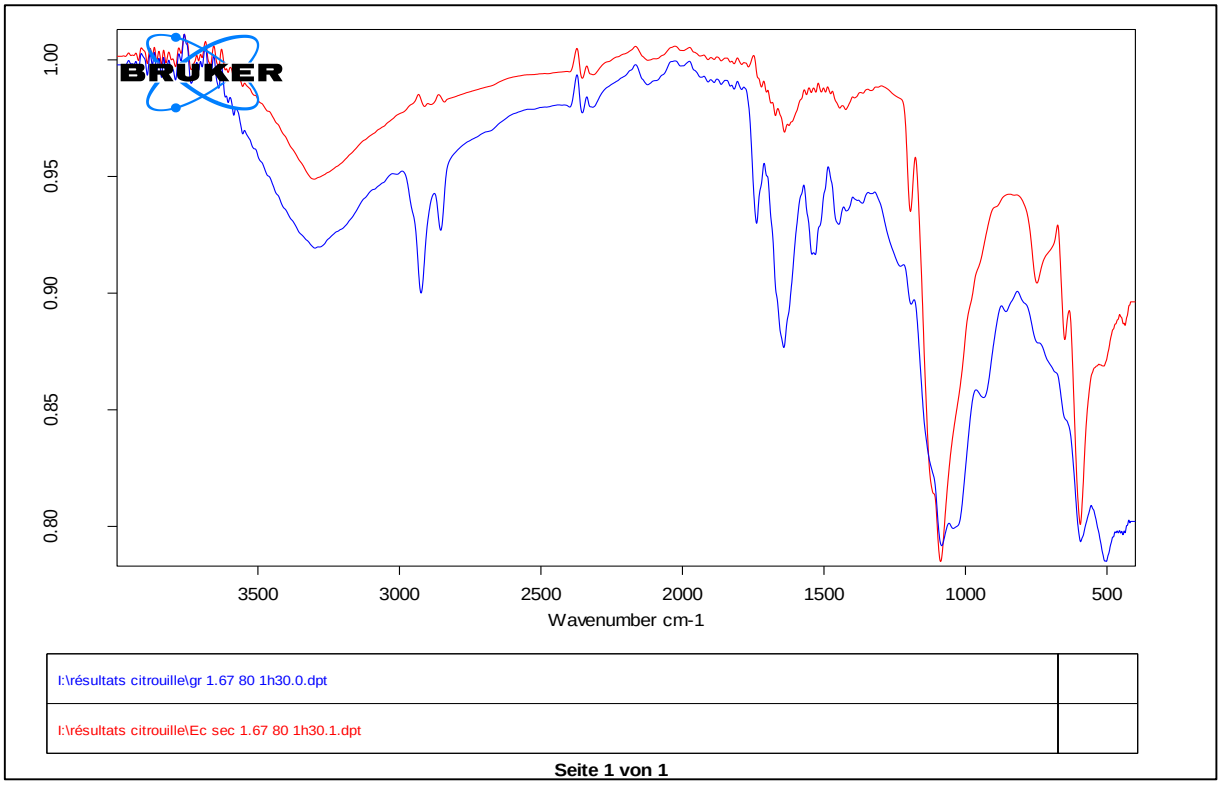


Figure III-9 : spectre FTIR de la pectine extraite des écorces et grainessèches de courge usquée (t=90 min T=80°C) :___ graines, ___ écorces.

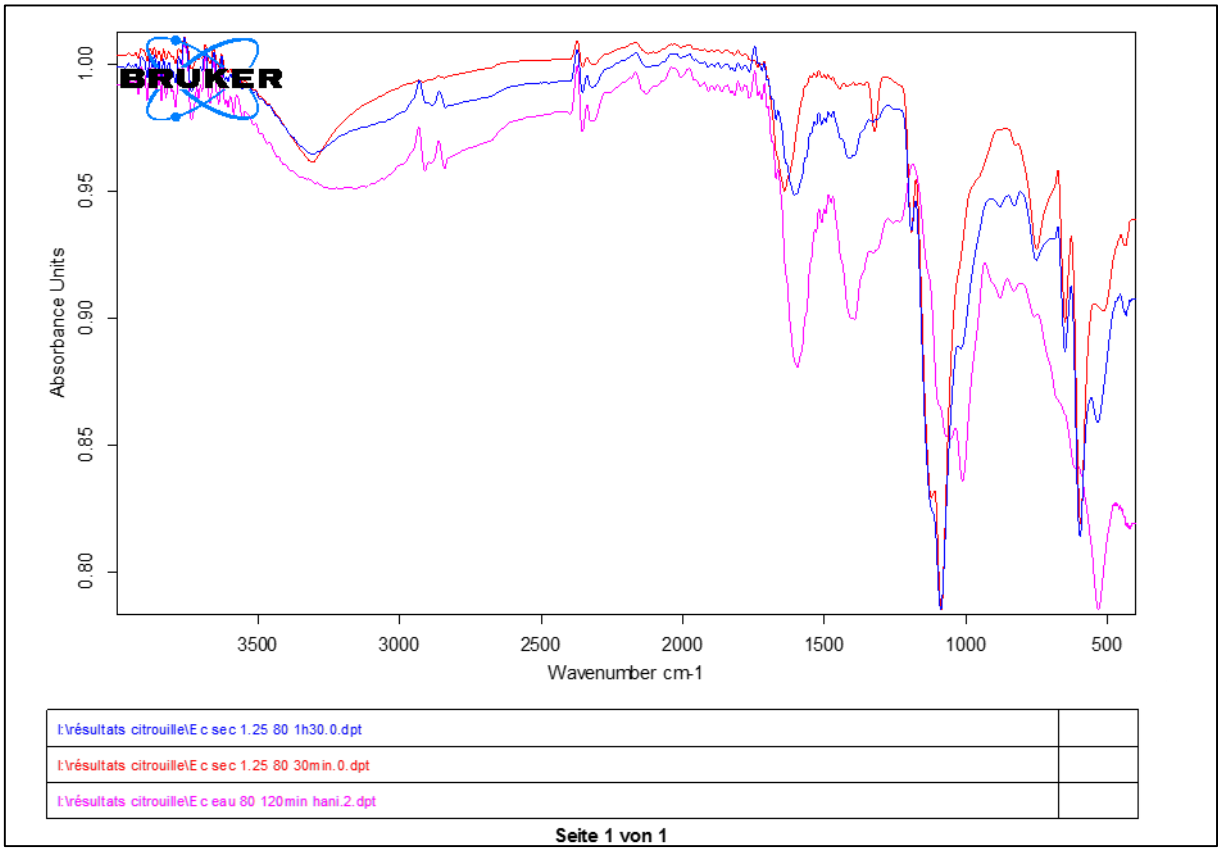


Figure III-10: Spectre FTIR de la pectine extraite des écorces sèches de courge musquée (pH=1,25min, T=80°C) :___ 90min, ___ 90 min, ___120min

III.2. dosage des polyphénols totaux :

L'extraction des polyphénols totaux à partir des écorces sèches par l'éthanol a donné un rendement de 0.6%. la teneur des composés phénoliques extraites exprimée en mg d'acide gallique / g d'extrait est estimé en se basant sur la courbe d'étalonnage pour l'acide gallique (figure III-11), cette équation est linéaire exprime les concentration en fonction des absorbances de la forme:

$$C= 0.0063\ X +0.3756 \qquad \textbf{(III-7)}$$

X : absorbance dans l'UV à 760nm.

C : concentration en mg EAG/ml.

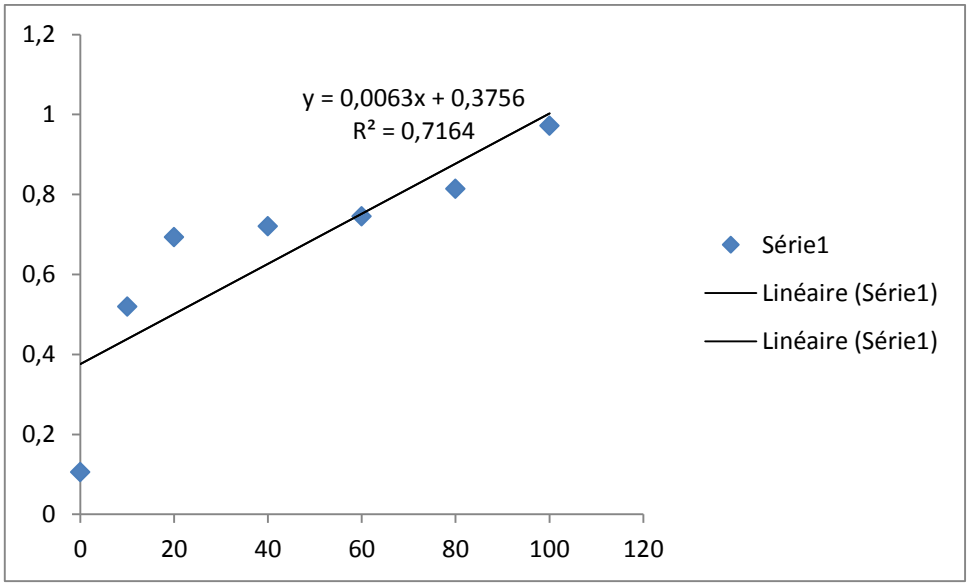


Figure III-11 : Courbe d'étalonnage (étalon : acide gallique)

L'extrait éthanoïque des écorces sèches du Cucurbita.moschata (Butternut) contient 37.59mg EAG/100g d'écorces séches.

D'après une étude menée par Wangcharoen et Morasuk. (2007) [75], sur les plantes culinaires récoltées en Thaïlande, la teneur en polyphénols totaux pour la chair de *Cucurbita moschata* (Decne) est égale à 24 ± 0,05mg EAG / 100g de la Matière fraiche, en utilisant l'éthanol 95% comme solvant d'extraction. Nawirska-Olszanska *et al*. (2011) [76], a rapporté une teneur en polyphénols des extraits méthanoïques de la chair de *Cucurbita maxima* (Karowita) récoltée en Japon égale à 23,64 ± 0,56mg EAG/100g. Ces valeurs obtenues sont inférieures à nos résultats,

ces variations sont probablement dues principalement à la résolution faible de l'équation de la courbe d'étalonnage. Le choix de solvant d'extraction, la variété de la courge, stade de maturation du fruit et leur origine géographique sont qui s'interfèrent pour faire la différence de rendement remarquée.

III.3. Activité antibactérienne :

Tous les disques imbibés d'extraits de composés polyphénoliques des écorces sèches de la courge musquée sont entourés des zones d'inhibition (figure III-12).La mesure des diamètres des zones d'inhibition de croissance des bactéries testées permet de collecter les résultats de l'activité antibactérienne des différentes solutions d'extrait éthanoïque (tableau III-4).

Tableau III-4 : Diamètres et pourcentages d'inhibition de l'extrait éthanoïque des polyphénols extraits des écorces de la courge musquée.

	C_0 (g/ml) 1.2 x 10^{-2}		**C_1 (g/ml) 2.4 x 10^{-3}**		**C_2 (g/ml) 1.2 x 10^{-3}**		**C_3 (g/ml) 8 x 10^{-4}**		**C_4 (g/ml) 6 x 10^{-4}**	
	DI(mm)	PI(%)	DI(mm)	PI(%)	DI(mm)	PI(%)	DI(mm)	PI(%)	DI(mm)	PI(%)
Streptocoque	15	57,89%	15	57,89%	15	57,89%	14,5	52,63%	14	47,36%
Enterobacter cloacae	12	26,31%	11,5	21,05%	11	15,78%	11	15,78%	10,5	10,52%
Staphylococcus aureus	13,5	42,10%	13	36,84%	12	26,31%	11,5	21,05%	11	15,78%
Klebsiella. oxitoca	11	15,78%	11	15,78%	11	15,78%	10,5	10,52%	10	5,26%
Entérocoque	15	50%	15	50%	14	40%	13,5	35%	12	20,31%
Escherichia coli	14	27,7%	13,5	22,72%	13	18,18%	12,5	13,63%	12	9%

L'analyse des résultats mentionnés sur le tableau III-4 a permis de tirer les remarques suivantes :

- l'extrait des polyphénols possèdent une activité antimicrobienne légèrement inhibitrice contre toutes les bactéries testées avec des diamètres de zones d'inhibition : 11mm≤ D≤ 16mm. Cette faiblesse d'activité est peut-être dû à la qualité de l'extrait ou

bien au manque en terme de concentration de ces composés en solutions testés qui a été le résultat du choix du solvant ou bien la méthode d'extraction.

- Les souches bactériennes *Streptocoque et Entérocoque* sont les plus sensibles envers les composés phénoliques des écorces de la courge musquée avec des PI de 57,89% à 47,36% et de 50% à 20 ;31% respectivement.
- *Enterobacter cloacae* et *Klebsiella. oxitoca sont* les souches bactériennes les plus résistantes envers les composés phénoliques testés, car les zones d'inhibition ne dépassent pas 12mm et 11mm respectivement.

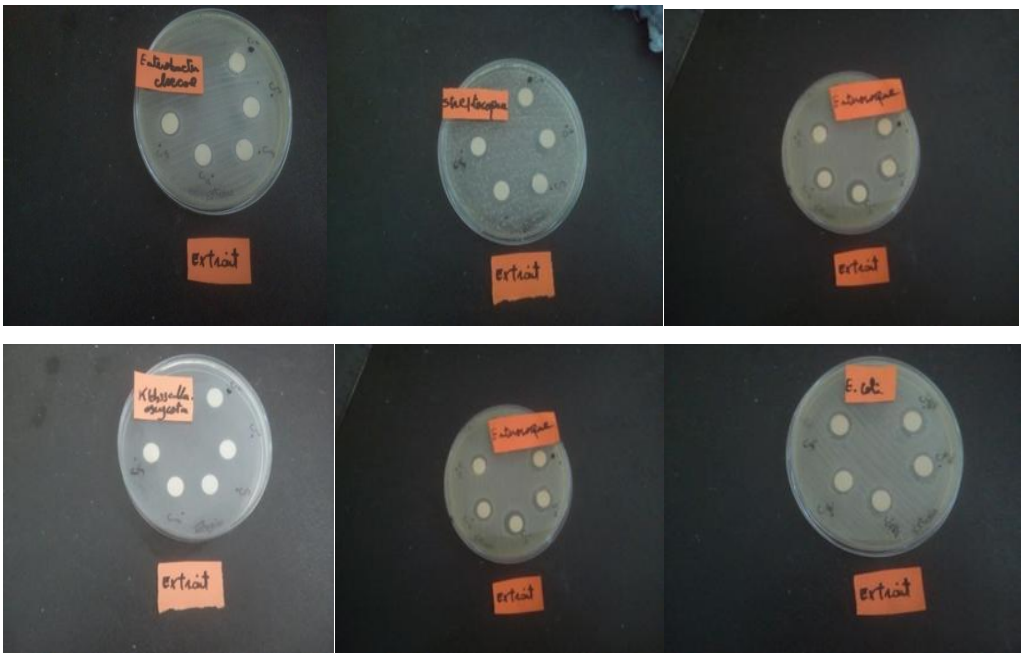


Figure III-12 : Diamètres des zones d'inhibition

Conclusion générale

L'objectif principal de notre étude consistait en une valorisation d'espèce de biomasse végétale le butternut qui est une variété de l'espèce Cucurbita.moschata du genre Cucurbita appartenant à la famille des Cucurbitacées cultivée dans l'Algérie. En effet sous cet aspect la réalisation de ce travail résidait en plusieurs intérêts :

- Une partie consacrée à l'extraction des pectines à partir des écorces, ainsi qu'à partir des graines à titre de comparaison portant tant sur le rendement que sur les propriétés physicochimiques des pectines extraites.

- Dévoiler pour les pectines extraites dans les différentes conditions opératoires les caractéristiques physico-chimiques pour suivre leur évolution avec la variation des paramètres d'extraction.

- Dosage des polyphénols totaux extraits par l'éthanol comme solvant à partir des écorces
- Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanoïque obtenu.

De notre recherche bibliographique on soulève l'importance d'espèce choisie dans cette étude sur le plan agroalimentaire de par leur propriétés nutritives très éfficaces en régime alimentaire basé sur les fibres, sur le plan industriel de par sa pectine et sur le plan médicinale de par leurs propriété antioxydante, etc.

Après avoir évalué les résultats de nos expériences, nous avons abouti aux conclusions suivantes :

- La courge musquée peut être une source prometteuse pour l'extraction des pectines et des polyphénols. Un rendement en pectine qui atteint 10.76% est enregistré pour les écorces sèches après un temps d'extraction de 120min par voie acide chaud. Un contenu de l'ordre de 37 mg GAE/ 1oog d'écorces sèches.
- Les pectines extraites sont des pectines hautement méthylées.
- Les écorces fraiches permettent d'extraire plus de pectines avant qu'elles soient séchées.

- Une distribution non-uniforme des pectines à travers le même fruit de courge musquée. Il a été trouvé que les rendements en pectines extraites par voie acide chaud donnent 9.33% pour les écorces sèches, 10,21% pour celles fraiches. Le plus faible rendement a été trouvé dans le cas des graines séchées de l'ordre de 7.35%.
- L'augmentation du temps d'extraction ainsi que l'augmentation du pH font augmenter le rendement en pectine.
- L'extraction des pectines par l'eau à chaud n'est pas favorable en termes de rendement mais permet d'aboutir à des pectines d'un poids équivalent et degré d'estérification plus important.
- Les paramètres opératoires d'extraction à savoir le temps et le pH affecte les propriétés physicochimiques tel que le DE, PE, MeO%.
- Les propriétés structurales déduites par la spectroscopie infrarouge relevant tous de même l'ensemble des pics caractéristiques des substances pectiques, néanmoins une différence en intensité de ces pics en fonction de la variabilité des conditions opératoires a été révélée aussi.
- Les polyphénols extraits des écorces sèches sont légèrement inhibiteur de certaine gamme de bactéries (*Streptocoque ; Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus ; Klebsiella oxitoca ;Entérocoque ; Escherichia coli).*

On a jugé utile en perspective d'optimiser les conditions opératoires pour l'extraction des pectines à partir cette source végétale, ainsi que de balayer d'autres modes d'extraction inovantes.

Approfondir la caractérisation des pectines afin de mieux corréler les phénomènes mis en jeu lors de l'extraction.